



## 研究报告

## 典型草原区不同生境反硝化菌群的空间特征

芦燕<sup>△1,2,3</sup> 曾静<sup>△2,3</sup> 赵吉<sup>1,2,3</sup> 王斌<sup>2,3</sup> 张少华<sup>1,2,3</sup> 希尼尼根<sup>4</sup> 于景丽<sup>\*1,2,3</sup>

1 蒙古高原生态与资源利用教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010021

2 内蒙古自治区环境污染控制与废物资源化重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010021

3 内蒙古大学生态与环境学院 内蒙古 呼和浩特 010021

4 内蒙古农业大学兽医学院 内蒙古 呼和浩特 010018

**摘要:**【背景】锡林河-河滨湿地-阶地草原是蒙古高原典型草原区代表性的水生-湿生-陆生生境,但不同生境中反硝化菌群的空间分布特征尚不明晰。【目的】阐明典型草原区不同生境反硝化菌群的组成、丰度、空间分布特征及异质性成因。【方法】利用 16S rRNA 基因测序研究锡林河流域水生、湿生、陆生生境 6 个样带沉积物/土壤细菌群落组成及相对丰度。基于 2014 年及以前文献报道的反硝化细菌及 16S rRNA 基因信息构建参比菌库,筛选生境关联的反硝化菌属。通过典范对应分析等探究反硝化菌群空间异质性成因。【结果】参比菌库包含 80 种反硝化细菌(65 个属),6 个样带测序获得的 469 个细菌属中 36 个为反硝化细菌属。3 种生境共存的反硝化细菌有 14 个属,其中黄杆菌属(1.65%–14.17%)和噬氢菌属(1.56%–1.69%)是水生和湿生生境共有的优势菌,假单胞菌属(1.85%)是低河漫滩样带的优势菌。空间分布特征显示反硝化菌群沿水生-湿生-陆生生境呈现先升后降的分布趋势,在低河漫滩湿地达到最高值。典范对应分析表明:黄杆菌属、噬氢菌属、气单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属等与 pH 值、水分及沙粒含量呈正相关关系,而芽孢杆菌属、链霉菌属、马杜拉放线菌属等与粘粒、粉粒、有机质、总氮含量等呈正相关关系。【结论】典型草原区反硝化菌群组成及丰度具有明显的生境异质性,低河漫滩湿地是反硝化细菌生长繁殖的最佳生境,由颗粒组成、水分含量和 pH 等环境因子共同驱动。

**关键词:** 典型草原, 代表生境, 反硝化菌群, 组成与丰度, 空间特征, 驱动力

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (41361053, 31660724); Natural Science Foundation of Inner Mongolia (2011MS0603, 2016MS0331, 2015MS0306)

△These authors equally contributed to this work

\*Corresponding author: E-mail: hot-yjl@163.com

Received: 05-04-2018; Accepted: 15-06-2018; Published online: 27-06-2018

基金项目: 国家自然科学基金(41361053, 31660724); 内蒙古自然科学基金(2011MS0603, 2016MS0331, 2015MS0306)

△对本文贡献相同

\*通信作者: E-mail: hot-yjl@163.com

收稿日期: 2018-04-05; 接受日期: 2018-06-15; 网络首发日期: 2018-06-27

## Spatial characteristics of denitrifying bacterial communities in different habitats from typical steppe

LU Yan<sup>Δ1,2,3</sup> ZENG Jing<sup>Δ2,3</sup> ZHAO Ji<sup>1,2,3</sup> WANG Bin<sup>2,3</sup> ZHANG Shao-Hua<sup>1,2,3</sup>  
Xininigen<sup>4</sup> YU Jing-Li<sup>\*1,2,3</sup>

1 Ministry of Education Key Laboratory of Ecology and Resource Use of the Mongolia Plateau, Hohhot, Inner Mongolia 010021, China

2 Inner Mongolia Key Laboratory of Environmental Pollution Control & Waste Resource Reuse, Hohhot, Inner Mongolia 010021, China

3 School of Ecology and Environment, Inner Mongolia University, Hohhot, Inner Mongolia 010021, China

4 College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China

**Abstract:** [Background] Xilin river-riparian wetland-terrace grassland are the most representative aquatic-humid-terrestrial habitats in typical steppe region of Mongolia plateau, but little is known about the spatial characteristics of denitrifying bacterial communities in different habitats. [Objective] To reveal the composition, abundance, spatial distribution of denitrifying bacterial communities in different habitats of typical steppe region and associated spatial heterogeneity. [Methods] Using 454 pyrosequencing of 16S rRNA gene, we characterized community compositions and abundance of sediment/soil denitrifying bacterial communities from 6 sampling zones associated with aquatic, humid and terrestrial habitats. Based on the information of denitrifying bacterial 16S rRNA gene from previous references before 2014, we constructed denitrifying bacteria library as a reference to screen denitrifying bacterial genera associated with habitats. Meanwhile, we explored spatial heterogeneity of denitrifying bacterial genera by canonical correspondence analysis (CCA). [Results] The reference library contained 80 denitrifying bacterial species (65 genera). Accordingly, 36 denitrifying bacterial genera were screened out of total 469 bacterial genera from 6 sampling zones. Fourteen denitrifying bacterial genera co-existed in aquatic-humid-terrestrial habitats. Among them, *Flavobacterium* (1.65%–14.17%) and *Hydrogenophaga* (1.56%–1.69%) were dominant denitrifying bacteria across aquatic and humid habitats. *Pseudomonas* (1.85%) was the dominant bacteria only in low-floodplain wetland. The spatial distribution characteristics showed a tendency, first increased and then decreased along the aquatic-humid-terrestrial habitats, and reached peak value in low-floodplain wetland habitats. CCA analysis showed that *Flavobacterium*, *Hydrogenophaga*, *Aeromonas* and *Sphingomonas* were positively correlated with pH, water and sand contents. Whereas *Bacillus*, *Streptomyces*, *Actinomadura* were positively correlated with contents of clay, silt, organic matter and total nitrogen. [Conclusion] The compositions and abundance of denitrifying bacterial communities in typical steppe region showed obvious habitat heterogeneity. Low-floodplain wetland was the suitable habitat for growth and reproduction of denitrifying bacteria, which were driven by multiple environmental factors such as sediment/soil particle compositions, water content and pH.

**Keywords:** Typical steppe, Representative habitats, Denitrifying bacterial communities, Composition and abundance, Spatial characteristics, Driving force

锡林河横贯内蒙古高原典型草原区，是“国际地圈-生物圈计划”(International Geosphere-Biosphere Program, IGBP)的重要组成部分<sup>[1-2]</sup>。由于气候干旱和过度放牧等自然和人为因素双重影响，锡林河主河道断流萎缩和典型草原退化问题日趋严重。典型草原区锡林河流域成为生态环境的敏感

脆弱地带和 IGBP 气候变化研究的焦点区域<sup>[3-5]</sup>。

反硝化作用是全球氮素生物地球化学循环的重要组成部分，也是水生、湿生、陆生系统氮素移除的关键过程和温室气体氧化亚氮(N<sub>2</sub>O)排放的主要途径。驱动反硝化脱氮的微生物称为反硝化菌，包括细菌、放线菌、古菌和真菌等。反硝化

菌广泛分布于土壤、水体和沉积物中, 包括富营养与寡营养环境、有氧与无氧环境、高盐碱和高温等极端环境<sup>[6-9]</sup>。

目前, 国内外关于反硝化菌的研究主要集中在菌株的分离培养、反硝化活力鉴定、富营养化水体脱氮等方面<sup>[10-12]</sup>, 并在反硝化菌株的形态观察、生理生化鉴定及 16S rRNA 基因同源性分析方面积累了大量的文献资料<sup>[10-12]</sup>。同时对反硝化菌群丰度与 N<sub>2</sub>O 释放关系的研究也取得了重要进展<sup>[13-15]</sup>。但关于水生、湿生、陆生等自然生境中反硝化菌群组成、丰度及空间分布特征的背景资料相对匮乏。

本文基于 2014 年及以前文献<sup>[1-15]</sup>报道的反硝化细菌构建反硝化菌属资源库, 通过 16S rRNA 基因测序研究典型草原区锡林河流域水生、湿生、陆生环境中沉积物/土壤细菌的群落结构组成及相对丰度。以反硝化菌属资源库作为参比, 筛选典型草原区锡林河流域不同生境中的反硝化菌属, 探讨生境关联的反硝化菌群组成、相对丰度及空间分布特征, 定量评估驱动反硝化细菌群落空间异质性的环境因子, 为及早预测典型草原区生境相关的氮素逸失和温室气体的释放提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样带选择、采样点设置及理化特性

研究区设在内蒙古锡林郭勒高原典型草原区——锡林河流域中游中国科学院内蒙古草原生态系统定位站西侧(43°36′–44°29′N, 115°32′–117°12′E)。该区属温带半干旱大陆性季风气候, 多年平均气温为-0.4 °C, 年平均降水量 336.9 mm, 其中 5–8 月份降水量占全年的 51%–89%。水生和湿生植被主要有水甜茅(*Glyceria triflora*)、散穗早熟禾(*Poa subfastigiata*)、灰脉苔草(*Carex appendiculata*)、鹅绒委陵菜(*Potentilla anserina*)、灯芯草(*Juncus effusus*)等群落, 陆生植被为羊草(*Leymus chinensis*)和大针茅(*Stipa grandis*)。典型草原区栗钙土粘粒

与细粉沙粒适中, 高河漫滩土壤以细、中粉沙粒为主, 低河漫滩土壤以中、粗粉沙粒为主, 河床沉积物以沙粒为主。由于过度放牧, 该区草原及湿地均表现出明显的退化特征。

采样时间为 2014 年 7 月上旬, 沿着垂直河流主线的方向依次选择锡林河河床水域带 R (代表水生生境)、河滨湿地带 W (代表湿生生境)、阶地草原带 T (代表陆生生境) 3 个代表性生境。水生生境划分为河流中心样带 R1 和河床边缘样带 R2; 湿生生境划分为低河漫滩样带 W1 和高河漫滩样带 W2, 高、低河漫滩均为鹅绒委陵菜群落(*Potentilla anserina*); 陆生生境划分为羊草(*Leymus chinensis*)样带 T1 和大针茅(*Stipa grandis*)样带 T2。6 个沉积物/土壤样品均按样带进行布点, 样带中心间距 50 m, 用沉积物采样器/土钻采集表层 0–10 cm 沉积物/土壤。样带按照 S 型进行 5 点取样, 混合后制备成一个样品(约 1 kg)置于无菌塑料袋中, 24 h 内用冰盒运到实验室。按照四分法分取样品, 部分样品-80 °C 保存供分子生物学分析, 其余土样风干、研磨、过筛供理化因子检测。沉积物/土壤样品的理化特性如下: 粘粒组成(Clay) (<2 μm): 0.01%–13.22%; 粉粒(Silt) (2 μm–20 μm): 0.07%–24.84%; 沙粒(Sand) (>20 μm): 61.94%–99.92%; 含水量(WC): 14.17%–26.88%; pH 8.31–8.90; 溶解性盐(DS): 0.31–2.32 g/kg; 有机质(OM): 4.45–25.90 g/kg; 总氮(TN): 0.44–2.79 g/kg; 总磷(TP): 0.03–0.81 g/kg。

### 1.2 沉积物/土壤 DNA 的提取、PCR 和焦磷酸测序

沉积物/土壤样品充分混匀后称取 0.5 g, 按文献<sup>[16]</sup>进行微生物基因组总 DNA 提取。利用 16S rRNA 基因 V1–V3 区引物进行 PCR 扩增。引物使用 8F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)加 A 接头引物(5′-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-3′), 533R (5′-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3′)加 B 接头引物(5′-CTATGCGCCTTGCCAGCCCCGCTCA G-3′)<sup>[17]</sup>。每个样品加 10 bp 标签序列以示区别。

R1: CTCTACAGCG, R2: CTGTCGTGCG, W1: GACGTATGAC, W2: GACTAGCTAG, T1: GAGACGTCGC, T2: GCGTAGACTA.

PCR 反应体系(20  $\mu$ L): DNA 模板(10 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, *FastPfu* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L, 5 $\times$ *FastPfu* buffer 4  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, 正、反向引物(5  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ L, 超纯水补至 20  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 2 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 25 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。所有样品的 PCR 产物经纯化和定量后送往上海美吉生物医药科技有限公司, 采用罗氏基因组 GS-FLX 454 Titanium 测序平台进行高通量测序。

### 1.3 测序数据分析

将测序接头、标签和前引物序列去除后得到有效序列, 进一步修剪、去除非特异性扩增片段、模糊碱基、单碱基高重复区以及长度过短的序列, 通过 Mothur (<http://www.mothur.org>)抽提长度>250 bp 的优化序列, 用 SILVA 数据库(<http://www.arb-silva.de>)中 Aligned 的 16S rRNA 基因进行序列比对, 通过 Mothur 最近邻接法聚类生成 OTU (Operational taxonomic unit), 相似性达到 95% 的归为同一个细菌属, 分析每个细菌属在总细菌组成中的相对丰度。计算测序文库的覆盖度(Coverage)、Shannon 和 Simpson 等  $\alpha$  多样性指数。

### 1.4 构建反硝化菌数据库

检索 2014 年及以前发表的关于反硝化细菌 16S rRNA 基因信息的文献, 抽提出文献中涉及到的全

部反硝化细菌属<sup>[1-15]</sup>, 通过文献中的登录号从 NCBI 中下载反硝化菌属和相应的 16S rRNA 基因序列, 构建反硝化菌属 16S rRNA 基因序列参比数据库。利用 MEGA 6.0 软件中 ClusterW 模块对下载的反硝化菌属 16S rRNA 基因进行对齐处理, 用邻接(Neighbor-Joining)法对 16S rRNA 基因序列进行同源性比较, 选择 Bootstrap 值 1 000 以及 Kimura 2 参数模型构建反硝化菌属 16S rRNA 基因序列系统进化树, 流程见图 1。

### 1.5 数据的统计分析

采用 SPSS 16.0 软件进行 Pearson 相关性分析。用 Excel 2007 和 Origin Lab 8.5 软件(<http://www.originlab.com>)进行基本图形绘制。用百迈客生物云计算平台(BMKCloud)内置 R 语言绘制 Heatmap 图。用 CANOCO 4.5.1 (Biometris-Plant Research International, Wageningen, Netherlands)进行典型对应分析(Canonical correspondence analysis, CCA)研究反硝化细菌群落组成丰度和环境因子的多重相关性。用上海美吉生物医药科技有限公司 I-Sanger 一站式生物信息云平台内置软件进行主坐标分析(Principal coordinate analysis, PCoA)。

## 2 结果与分析

### 2.1 焦磷酸测序结果分析

通过焦磷酸测序 6 个样带共获得 34 749 条优质序列, 平均长度 475 bp, 其中河床中心样带 R1 含 6 728 条序列(2 751 个 OTU), 河床边缘样带 R2 含 7 281 条序列(1 191 个 OTU), 低河漫滩样带 W1

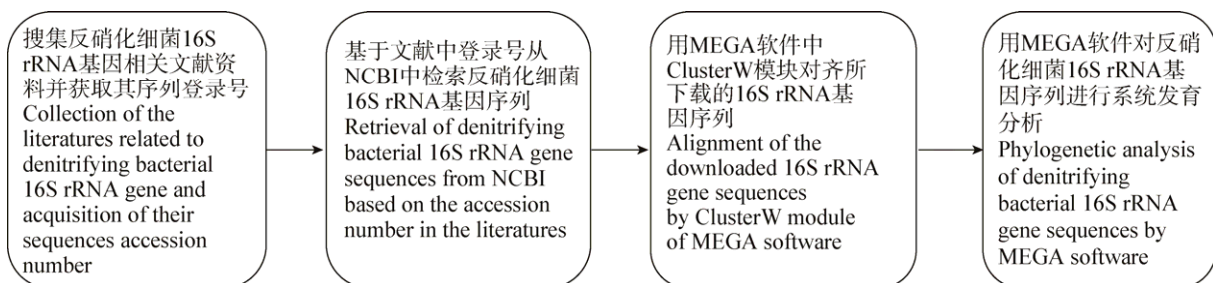


图 1 基于反硝化菌 16S rRNA 基因文献信息学建库的流程图

Figure 1 Technology roadmap to construct denitrifying bacterial library based on 16S rRNA gene

含 7 636 条序列(2 200 个 OTU), 高河漫滩样带 W2 包括 7 101 条序列(2 343 个 OTU), 羊草(*Leymus chinensis*)样带 T1 包括 6 534 条序列(2 418 个 OTU), 大针茅(*Stipa grandis*)样带 T2 包括 7 062 条序列(2 503 个 OTU)。样带 R1、R2、W1、W2、T1、T2 的测序深度(Coverage)依次为 86.59%、88.67%、93.22%、88.79%、90.39%、90.89%。6 个样带共获得 469 个细菌属, 其中样带 R1、R2、W1、W2、T1 和 T2 分别有 160、268、304、208、135、114 个细菌属, 对应的 Shannon 和 Simpson 多样性指数分别为 0.44 和 0.80、0.41 和 0.82、1.28 和 0.52、0.67 和 0.70、0.36 和 0.85、0.31 和 0.89。

## 2.2 反硝化细菌库及系统发育分析

基于反硝化细菌 16S rRNA 基因文献资料, 共得到 80 种反硝化细菌(65 个属), 隶属于变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)。其中, 变形菌门是最优势的门类, 包含 51 个反硝化细菌属;  $\alpha$ -变形菌纲( $\alpha$ -*Proteobacteria*)包含 17 个反硝化细菌属;  $\beta$ -变形菌纲( $\beta$ -*Proteobacteria*)包含 17 个菌属;  $\gamma$ -变形菌纲( $\gamma$ -*Proteobacteria*)包含 17 个菌属; 拟杆菌门包含 5 个反硝化菌属; 放线菌门包含 11 个菌属; 厚壁菌门包含 13 个菌属(图 2)。

## 2.3 反硝化细菌群落结构组成、丰度及空间分布特征

以库中 80 种反硝化细菌(65 个属)作为参比, 6 个样带共筛选出 36 个反硝化细菌属。其中样带 R1、R2、W1、W2、T1、T2 分别含有 22、20、28、20、10、18 个反硝化细菌属。不同生境中沉积物/土壤反硝化菌群落的累积相对丰度依次为 4.46% (R1)、6.36% (R2)、20.91% (W1)、7.30% (W2)、2.46% (T1)、1.61% (T2)。沿水生-湿生-陆生梯度呈现先升高后降低的单峰空间分布趋势, 并在河漫滩湿地样带 W1 达到最高值(图 3A)。综上, 反硝化细菌群落具有生境异质性, 低河漫滩样带 W1 是反硝化菌群最理想的栖息地, 高河漫滩样带 W2、河

流中心样带 R1 和河床边缘样带 R2 是反硝化菌群较理想的生境, 羊草(*Leymus chinensis*)样带 T1 和大针茅(*Stipa grandis*)样带 T2 不适合反硝化菌群的大量繁殖。

依据各个生境单个菌属相对丰度的高低, 将反硝化细菌分为 5 个等级: 极低( $\leq 0.20\%$ ), 低 (0.20%–0.50%), 中 (0.50%–1.00%), 高 (1.00%–1.50%), 极高( $\geq 1.50\%$ )。据此, 将相对丰度极高和高的反硝化菌属作为优势菌。结果发现 *Flavobacterium* 和 *Hydrogenophaga* 是典型草原区锡林河河床(R1 和 R2)和河漫滩生境(W1 和 W2)最丰富的优势菌, *Flavobacterium* 在样带 R1、R2、W1、W2 的相对丰度依次为 2.25%、1.65%、14.17%、3.81%; *Hydrogenophaga* 在样带 R1 和 W1 的相对丰度分别是 1.56%和 1.69%; *Pseudomonas* 只是低河漫滩样带 W1 的优势菌, 相对丰度为 1.85%。

图 3B 显示了不同生境反硝化细菌群落独有和共有的菌属, 水生、湿生、陆生 3 种生境共存的反硝化细菌属有 14 个: *Flavobacterium*、*Pseudomonas*、*Hydrogenophaga*、*Acinetobacter*、*Bacillus*、*Rhizobium*、*Stenotrophomonas*、*Rhodospirillaceae*、*Microbacterium*、*Paenibacillus*、*Arthrobacter*、*Sphingobacterium*、*Comamonas*、*Rhodococcus*; 水生及湿生生境共存的反硝化菌属有 7 个: *Aeromonas*、*Hyphomicrobium*、*Derrxia*、*Ochrobactrum*、*Thauera*、*Paracoccus*、*Thiobacillus*; 水生及陆生生境共存的反硝化菌属有 2 个: *Herbaspirillum*、*Brevibacterium*; 湿生及陆生生境共存的反硝化菌属有 2 个: *Sphingomonas*、*Delftia*; 水生生境独有的反硝化细菌属有 4 个: *Alcaligenes*、*Vibrio*、*Planomicrobium*、*Brevibacillus*; 湿生生境独有的反硝化细菌属 5 个: *Propionibacterium*、*Cytophaga*、*Zoogloea*、*Neisseriaceae*、*Enterobacter*; 陆生生境独有的反硝化细菌属 2 个: *Streptomyces*、*Actinomadura*。

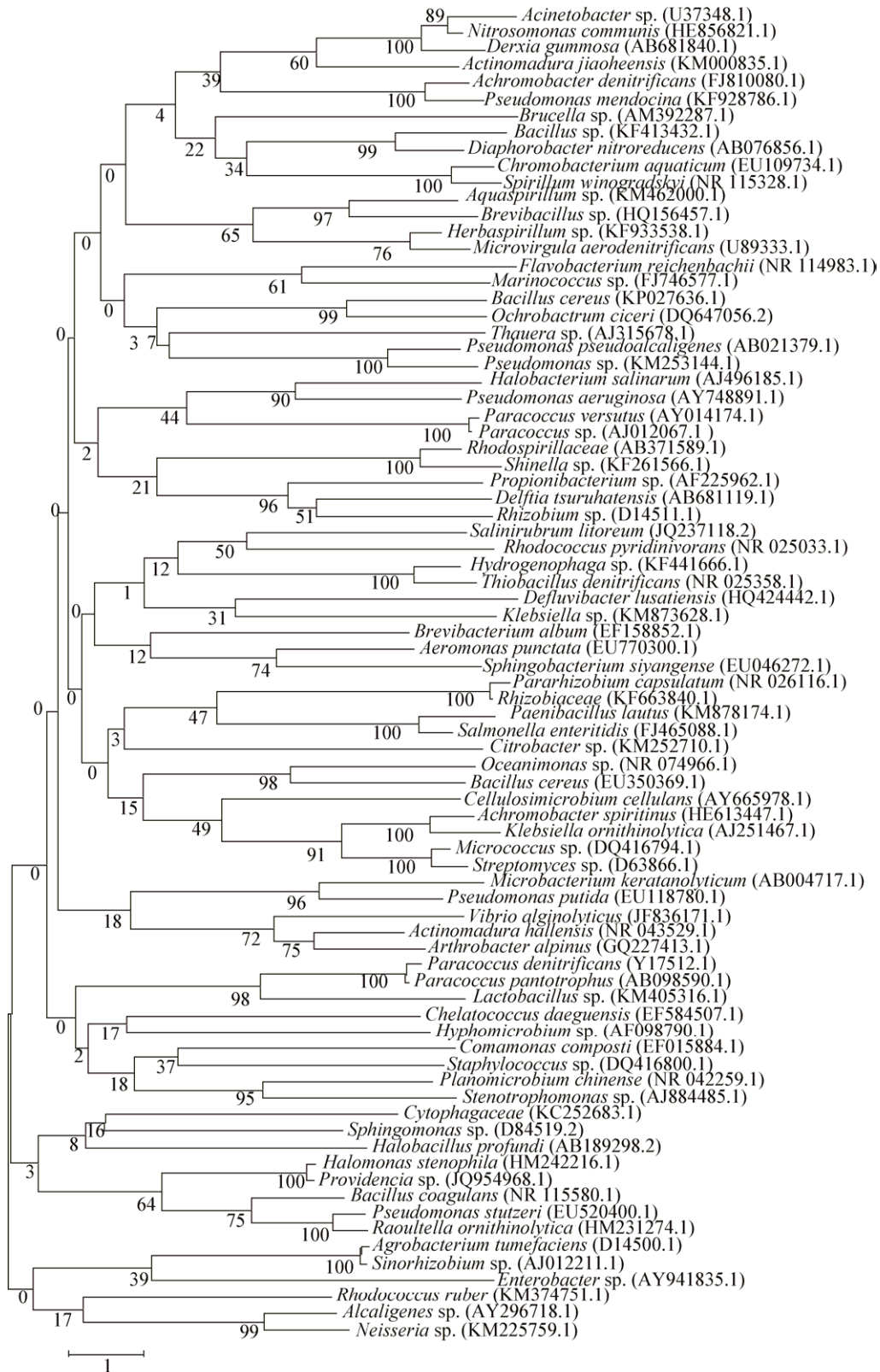


图 2 反硝化菌库 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 2 16S rRNA gene phylogenetic tree of denitrifying bacterial genera library



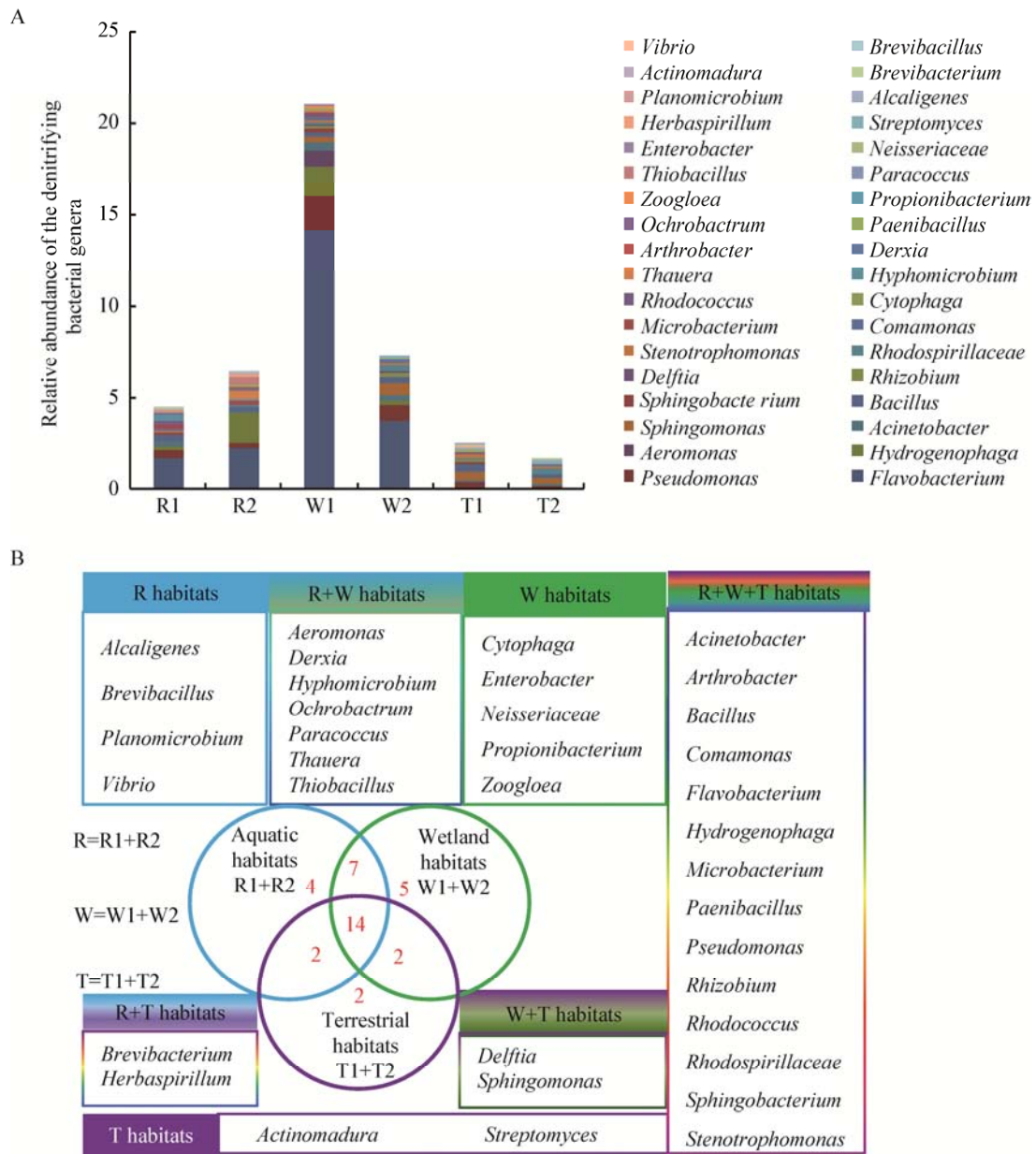


图 3 反硝化细菌群落的空间特征的累计柱状图(A)和 Venn 图(B)

Figure 3 Spatial characteristics of denitrifying bacterial communities based on Cumulative histogram (A) and Venn diagram (B)

2.4 不同生境反硝化细菌群落的  $\beta$  多样性分析

从图 4 可知, 水生生境样带 R1 与 R2 相似性较高而聚为一类, 湿生生境样带 W1 与 W2 相似性较高而聚为一类, 陆生生境样带 T1 与 T2 相似性较高而聚为一类。3 种生境之间水生和湿生生境更为相似而聚在一起, 但陆生生境单独占据一大分支。总体而

言, 水生(R1、R2)和湿生(W1、W2)生境中反硝化细菌群落组成及相对丰度占有极高的份额。PCoA 用来探讨 6 个样带反硝化菌群的聚类关系。由图 4 可以看出, PCoA1 与 PCoA2 主成分的方差解释百分比分别为 81.8%、11.2%, 累计方差解释百分比为 93.0%。在不同生境中反硝化菌群具有明显的空间异质性。

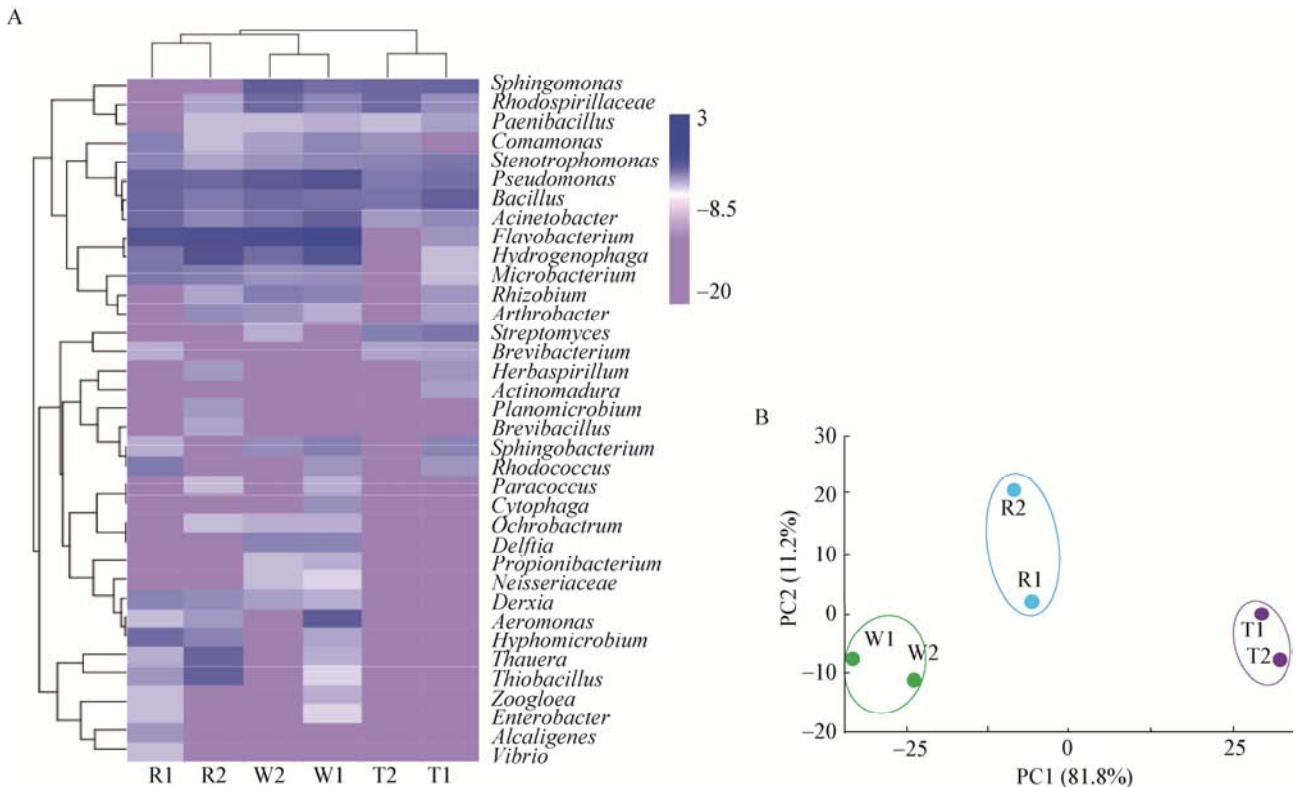


图4 反硝化细菌群落的热图(A)和主坐标(B)分析

Figure 4 Heatmap (A) and PCoA (B) analysis of denitrifying bacterial communities

## 2.5 水生-湿生-陆生生境反硝化菌群的空间异质性成因

通过 CCA 分析(图 5)发现水生和湿生生境相对寡营养由沙粒含量、pH、含水量(WC)正向驱动,而陆生生境营养相对丰富由粉/粘粒含量、有机质(OM)、全氮(TN)、总磷(TP)、溶解性盐(DS)正向驱动;绝大多数反硝化菌群交错分布在水生和湿生生境,尤其是低河漫滩 W1 样带,与沉积物/土壤中沙粒含量、pH、含水量(WC)呈现正相关关系;少部分反硝化菌群,例如 CCA 图中第 13 号菌 *Streptomyces*、第 26 号菌 *Brevibacterium* 和第 28 号菌 *Actinomadura* 集中分布在陆生生境,与沉积物/土壤的粉/粘粒含量、有机质(OM)、全氮(TN)、总磷(TP)、溶解性盐(DS)含量呈现正相关关系。

由 Pearson 相关性分析(表 1)可知, *Flavobacterium*、*Pseudomonas*、*Hydrogenophaga*、*Acinetobacter*、*Rhizobium*、*Deftia* 等反硝化菌属

与沙粒含量、pH、含水量(WC)呈现正相关关系,与粉/粘粒含量、有机质(OM)、全氮(TN)、总磷(TP)、溶解性盐(DS)呈现负相关关系。而 *Stenotrophomonas*、*Streptomyces*、*Brevibacterium* 等与沙粒含量、pH、含水量(WC)呈现负相关关系,与粉/粘粒含量、有机质(OM)、全氮(TN)、总磷(TP)、溶解性盐(DS)呈现正相关关系。

简言之, Pearson 相关性分析结果和 CCA 分析结果基本一致。

## 3 讨论

### 3.1 反硝化细菌生态学研究方法学解析

参与反硝化脱氮的微生物主要是反硝化细菌。Gamble 等通过传统的分离培养鉴定发现 22.6% 的反硝化细菌不能进行分类注释(Ungrouped)<sup>[18]</sup>。传统的反硝化菌筛选主要是基于反硝化功能驱动的分选培养法来进行,菌株种属的鉴定主要通过形



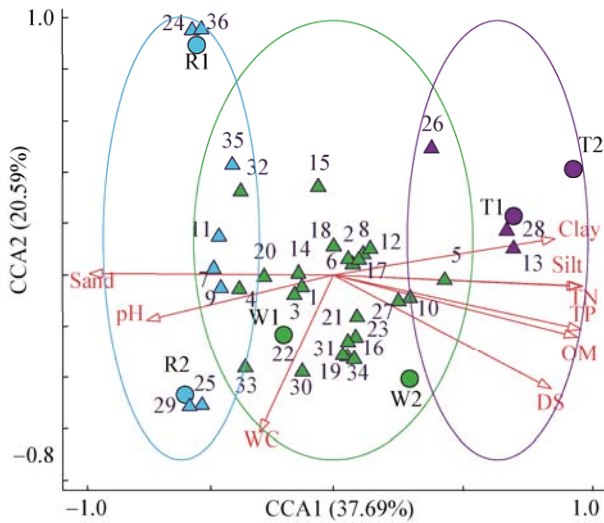


图5 反硝化细菌群落与理化因子的 CCA 分析

Figure 5 CCA of denitrifying bacterial communities and physicochemical factors

注: 1: 黄杆菌属; 2: 假单胞菌属; 3: 噬氢菌属; 4: 气单胞菌属; 5: 芽孢杆菌属; 6: 不动杆菌属; 7: 鞘氨醇单胞菌属; 8: 鞘氨醇杆菌属; 9: 根瘤菌属; 10: 戴尔福特菌属; 11: 嗜麦芽寡养单胞菌属; 12: 光合红螺菌科; 13: 丛毛单胞菌属; 14: 微杆菌属; 15: 噬胞菌属; 16: 红球菌属; 17: 生丝微杆菌属; 18: 类芽孢杆菌属; 19: 德克斯氏菌属; 20: 节杆菌属; 21: 苍白杆菌属; 22: 索氏菌属; 23: 丙酸杆菌属; 24: 动胶杆菌属; 25: 副球菌属; 26: 硫杆菌属; 27: 奈瑟菌科; 28: 肠杆菌属; 29: 链霉菌属; 30: 草螺菌属; 31: 短杆菌属; 32: 马杜拉放线菌属; 33: 产碱菌属; 34: 游动球菌属; 35: 短芽孢杆菌属; 36: 弧菌属。WC: 含水量; OM: 有机质; TN: 全氮; TP: 总磷; DS: 溶解性盐。圆圈表示样点; 三角表示反硝化菌属。

Note: 1: *Flavobacterium*; 2: *Pseudomonas*; 3: *Hydrogenophaga*; 4: *Aeromonas*; 5: *Bacillus*; 6: *Acinetobacter*; 7: *Sphingomonas*; 8: *Sphingobacterium*; 9: *Rhizobium*; 10: *Delftia*; 11: *Stenotrophomonas*; 12: *Rhodospirillaceae*; 13: *Comamonas*; 14: *Microbacterium*; 15: *Cytophaga*; 16: *Rhodococcus*; 17: *Hyphomicrobium*; 18: *Paenibacillus*; 19: *Derxia*; 20: *Arthrobacter*; 21: *Ochrobactrum*; 22: *Thauera*; 23: *Propionibacterium*; 24: *Zoogloea*; 25: *Paracoccus*; 26: *Thiobacillus*; 27: *Neisseriaceae*; 28: *Enterobacter*; 29: *Streptomyces*; 30: *Herbaspirillum*; 31: *Brevibacterium*; 32: *Actinomadura*; 33: *Alcaligenes*; 34: *Planomicrobium*; 35: *Brevibacillus*; 36: *Vibrio*. WC: Water content; OM: Organic matter; TN: Total nitrogen; TP: Total phosphorus; DS: Dissolved salt. The circles represent the sample points; The triangles represent the denitrifying bacterial genera.

态观察、生理生化特性及 16S rRNA 基因同源性分析来进行<sup>[19-20]</sup>。无疑通过纯培养手段获得的反硝化菌株给人以直观的认识,丰富了反硝化菌资源库。但环境样品中可培养的微生物不足总数的 0.1%–10%,因此,大量不可培养的微生物不能被分类识别。高通量测序作为新型分子生态技术为

功能菌群的海量筛选提供了契机<sup>[21-23]</sup>。尽管 Pyrosequencing 和 Illumina 等高通量测序 (High-throughput sequencing) 技术在微生物多样性研究中发挥了举足轻重的作用,但仍有 59.01% (R1)、54.98% (R2)、40.29% (W1)、58.49% (W2)、80.38% (T2)、82.84% (T1) 的无分类等级 (No\_Rank) 细菌属,说明在“属”水平上很多细菌的分类鉴定尚未被揭晓。由此可见,反硝化细菌的深度测序以及数据库的扩建工作有待进一步加强。本研究基于 2014 年及以前报道的反硝化细菌 16S rRNA 基因信息学资料<sup>[1-15]</sup>构建了微型反硝化菌数据库,为今后反硝化菌扩库工作奠定了基础。

16S rRNA 基因方法一直被认为是微生物生态领域研究细菌群落多样性的金标准<sup>[24]</sup>。直至 2013 年,原核微生物 16S rRNA 基因组内多样性的发现刷新了人们对细菌群落多样性的认识<sup>[24]</sup>。Sun 等研究发现,细菌 16S rRNA 基因自身多拷贝特征 (基因组内多样性) 会导致细菌群落多样性被高估<sup>[24]</sup>。在 0.05 差异水平上,16S rRNA 基因 V1–V3 区包含组内多样性 (907 个 OTU) 比剔除基因组内多样性 (856 个 OTU) 要高估 6.0%,而 V4–V5 区的高估程度最低 (1.6%),V6 区的高估程度最高 (9.8%)<sup>[24]</sup>。本研究由于未剔除 16S rRNA 基因组内多样性,直接选择 16S rRNA 基因 V1–V3 区的 OTU 数量计算反硝化菌群多样性,会导致反硝化菌群  $\alpha$  和  $\beta$  多样性计算值偏高,但本研究选择的 V1–V3 区高估程度会低于 Sun 等<sup>[24]</sup> 报道的 V6 区而高于 V4–V5 区。建议在今后研究古菌和细菌多样性时剔除 16S rRNA 基因内部多样性问题,以便更客观地反映原核微生物群落  $\alpha$  和  $\beta$  多样性真实情况。同时,本研究未剔除 16S rRNA 基因组内多样性,直接用 OTU 数量计算的相对丰度数值也会偏高。因此,黄杆菌属 (1.65%–14.17%)、噬氢菌属 (1.56%–1.69%) 以及假单胞菌属 (1.85%) 等优势菌属的相对丰度会比真实值高。简言之,本研究未剔除 16S rRNA 基因组内多样性导致反硝化菌群  $\alpha$  和  $\beta$  多样

表 1 沉积物/土壤理化参数与反硝化细菌属之间的皮尔逊相关性分析

Table 1 Pearson correlations between sediment/soil physicochemical parameters and denitrifying bacterial genera

反硝化菌属 Denitrifying bacterial genera	含水量 WC	pH	溶解性盐 DS	有机质 OM	总氮 TN	总磷 TP	粘粒 Clay	粉粒 Silt	沙粒 Sand
<i>Flavobacterium</i>	0.66**	0.51*	-0.25	-0.41	-0.44	-0.18	-0.53*	-0.54*	0.56*
<i>Pseudomonas</i>	0.69**	0.55*	-0.25	-0.39	-0.43	-0.14	-0.54*	-0.50*	0.54
<i>Hydrogenophaga</i>	0.51*	0.45	-0.25	-0.50*	-0.558	-0.44	-0.58*	-0.67**	0.65**
<i>Aeromonas</i>	0.44	0.34	-0.17	-0.36	-0.33	-0.11	-0.42	-0.49*	0.49*
<i>Sphingomonas</i>	0.29	-0.16	0.61**	0.70**	0.58*	0.75**	0.38	0.68**	-0.60**
<i>Acinetobacter</i>	0.59**	0.74**	-0.56*	-0.65**	-0.64**	-0.38	-0.69**	-0.69**	0.72**
<i>Thiobacillus</i>	0.08	0.16	-0.20	-0.36	-0.42	-0.53*	-0.33	-0.45	0.40
<i>Bacillus</i>	-0.30	-0.04	0.01	0.15	0.14	0.24	-0.03	0.23	-0.14
<i>Thauera</i>	0.06	0.13	-0.13	-0.30	-0.36	-0.48*	-0.28	-0.39	0.34
<i>Rhodospirillaceae</i>	0.18	-0.21	0.60**	0.66**	0.62**	0.66**	0.61**	0.67**	-0.66**
<i>Hyphomicrobium</i>	-0.10	0.46	-0.87**	-0.82**	-0.72**	-0.85**	-0.53*	-0.71**	0.67**
<i>Stenotrophomonas</i>	-0.49*	-0.30	0.29	0.35	0.43	0.50*	0.32	0.38	-0.36
<i>Streptomyces</i>	-0.69**	-0.88**	0.74**	0.83**	0.88**	0.79**	0.79**	0.85**	-0.85**
<i>Microbacterium</i>	0.30	0.59**	-0.85**	-0.86**	-0.87**	-0.91**	-0.74**	-0.82**	0.81**
<i>Rhodococcus</i>	-0.17	0.18	-0.70**	-0.59**	-0.49*	-0.51*	-0.42	-0.48*	0.49*
<i>Rhizobium</i>	0.76**	0.37	0.11	0.08	-0.11	0.17	-0.33	-0.01	0.12
<i>Sphingobacterium</i>	0.39	0.17	0.09	0.05	-0.04	0.26	-0.30	-0.03	0.13
<i>Comamonas</i>	0.12	0.26	-0.61**	-0.55*	-0.42	-0.46	-0.25	-0.47*	0.42
<i>Deftia</i>	0.84**	0.59**	-0.03	-0.08	-0.21	0.09	-0.36	-0.16	0.24
<i>Derxia</i>	0.20	0.52*	-0.78**	-0.75**	-0.75**	-0.85**	-0.60**	-0.68**	0.67**
<i>Arthrobacter</i>	0.38	0.25	0.15	0.06	-0.12	-0.04	-0.26	-0.04	0.10
<i>Cytophaga</i>	0.39	0.34	-0.11	-0.27	-0.25	-0.03	-0.34	-0.40	0.40
<i>Herbaspirillum</i>	-0.30	-0.38	0.24	0.19	0.12	0.06	0.01	0.14	-0.11
<i>Alcaligenes</i>	-0.14	0.22	-0.72**	-0.58*	-0.49*	-0.59**	-0.32	-0.44	0.42
<i>Planomicrobium</i>	0.03	-0.01	-0.07	-0.19	-0.25	-0.37	-0.18	-0.25	0.22
<i>Brevibacterium</i>	-0.83**	-0.67**	0.30	0.43	0.56*	0.43	0.58*	0.54*	-0.56*
<i>Paenibacillus</i>	-0.11	-0.34	0.45	0.40	0.34	0.43	0.17	0.32	-0.28
<i>Actinomadura</i>	-0.45	-0.48*	0.42	0.46	0.42	0.48*	0.20	0.45	-0.38
<i>Brevibacillus</i>	0.04	0.03	-0.07	-0.21	-0.28	-0.41	-0.21	-0.29	0.25
<i>Ochrobactrum</i>	0.76**	0.58*	-0.05	-0.18	-0.32	-0.10	-0.43	-0.29	0.34
<i>Propionibacterium</i>	0.70**	0.35	-0.10	-0.16	-0.25	-0.02	-0.36	-0.24	0.29
<i>Zoogloea</i>	0.24	0.10	-0.16	-0.25	-0.23	-0.13	-0.25	-0.30	0.30
<i>Paracoccus</i>	0.30	0.11	-0.15	-0.33	-0.34	-0.28	-0.35	-0.43	0.41
<i>Neisseriaceae</i>	0.04	0.32	-0.78**	-0.71**	-0.60**	-0.63**	-0.48*	-0.62**	0.60**
<i>Enterobacter</i>	-0.12	0.17	-0.64**	-0.51*	-0.43	-0.53*	-0.29	-0.39	0.37
<i>Vibrio</i>	-0.12	0.17	-0.64**	-0.51*	-0.43	-0.53*	-0.29	-0.39	0.37

注: \*: 在 0.05 水平(双侧)上显著相关; \*\*: 在 0.01 水平(双侧)上显著相关。

Note: \*: Correlation was significant at the 0.05 level (2-tailed); \*\*: Correlation was significant at the 0.01 level (2-tailed).

性以及相对丰度计算值偏高, 这和乌梁素海浮游细菌 16S rRNA 基因多样性的研究结果具有相似性<sup>[25]</sup>。

### 3.2 典型草原区反硝化细菌的系统发育分析

以本研究构建的反硝化细菌库(图 2)作为参比, 筛选出的 36 个反硝化菌属隶属于变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和放线菌门(*Actinobacteria*)。变形菌门是最优势的类群, 包含 21 个反硝化菌属。其中,  $\alpha$ -变形菌纲(*Alpha-Proteobacteria*)包含光合红螺菌(*Rhodospirillaceae*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、生丝微球菌属(*Hyphomicrobium*)、脱氮副球菌属(*Paracoccus*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)等 6 个菌属;  $\beta$ -变形菌纲(*Beta-Proteobacteria*)包含产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、草螺菌属(*Herbaspirillum*)、德克斯氏菌属(*Derxia*)、硫杆菌属(*Thiobacillus*)、奈瑟菌(*Neisseriaceae*)、陶厄氏菌属(*Thauera*)、动胶杆菌属(*Zoogloea*)、氢噬胞菌属(*Hydrogenophaga*)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*)、戴尔福特菌属(*Delftia*)等 10 个属;  $\gamma$ -变形菌纲(*Gamma-Proteobacteria*)包含嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、弧菌属(*Vibrio*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)等 5 个属。拟杆菌门包括鞘脂杆菌纲的噬纤维细菌属(*Cytophaga*)和黄杆菌纲的黄杆菌属(*Flavobacterium*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)。厚壁菌门包含芽孢杆菌纲的 5 个反硝化菌属, 分别为短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、游动球菌属(*Planomicrobium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)。放线菌门包含放线菌亚纲的 7 个反硝化菌属, 分别为马杜拉属(*Actinomadura*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、黄色短杆菌属(*Brevibacterium*)。

### 3.3 反硝化细菌群落的多样性和空间异质性成因分析

黄杆菌属(*Flavobacterium*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)、副球菌属(*Paracoccus*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)等交错分布在水生、湿生和陆生等不同生境中, 这和前人的研究结果具有一致性<sup>[18]</sup>, 说明反硝化细菌广泛分布于土壤、水体及沉积物中。同时, 反硝化细菌既可生存在有机质贫乏的河床沉积物中, 又可出现在有机质相对富集的湿地和草原土壤中, 这和 Gamble 等的研究结果相吻合<sup>[18]</sup>, 说明反硝化细菌既包括能利用有机碳源的异养菌, 还包括能利用无机碳源的自养菌两大类。

大量研究证实 pH、溶氧、有机质、碳氮比、基质类型( $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ )、颗粒组成等是影响反硝化活性和菌群分布的重要环境因子<sup>[18,26-31]</sup>。本研究发现 *Flavobacterium*、*Pseudomonas*、*Hydrogenophaga*、*Acinetobacter*、*Rhizobium*、*Deftia* 等反硝化菌属偏好沙粒、营养相对贫瘠的水生和湿生生境, 与 pH、沙粒、含水量显著正相关( $P<0.05$ ), 与粉/粘粒含量、有机质、全氮、总磷、溶解性盐呈现负相关关系。而 *Stenotrophomonas*、*Streptomyces*、*Brevibacterium* 等偏好粉/粘粒和营养相对丰富的陆生生境, 与含量、有机质、全氮、总磷、溶解性盐呈现正相关关系, 与沙粒、pH、含水量呈现负相关关系。这说明典型草原区锡林河流域不同生境反硝化细菌群落的空间分布特征由沙粒、粉/粘粒、pH、含水量、碳氮磷含量等多种环境因子共同驱动所致。

本研究筛选的 36 个反硝化细菌属中有 28 个出现在河漫滩湿地样带, 累计丰度明显高于水生及陆生生境样带, 这和崇明东滩氮循环菌群的空间分布特征有相似性<sup>[32]</sup>。Chiaromonte 等研究证实丰水期河漫滩水流的周期性变化及养分的径流作用促进了总细菌数量增加和群落组成变化, 指明河漫滩水流的周期性变化是驱动细菌群落及多样性变化的重要因素<sup>[33]</sup>。这和本研究结果有一致性,

夏季典型草原区周期性降雨造成河漫滩厌氧和好氧环境交替,有利于厌氧和好氧反硝化菌群交错增长,丰富了河漫滩土壤反硝化菌群的种类组成和相对丰度。3种生境共存的优势反硝化菌 *Flavobacterium*、*Hydrogenophaga* 和 *Pseudomonas* 均在低河漫滩样带 W1 达到丰度最高值 14.17%、1.69% 和 1.85%。Michaud 等<sup>[34]</sup>通过依赖和不依赖于 PCR 等多相分子技术研究南极洲浅水湖泊微生物的群落组成,也发现和本研究同样的优势菌 *Flavobacterium* 和 *Pseudomonas*,说明这些优势菌广泛分布于南北极淡水湖泊、池塘、河流、冰川和内陆河及湿地。河漫滩湿地土壤细菌群落 Shannon 和 Simpson 多样性指数为 1.28 和 0.52 (W1)、0.67 和 0.70 (W2),明显高于水生生境 R1 样带 0.44 和 0.80、R2 样带 0.41 和 0.82、陆生生境 T1 样带 0.36 和 0.85、T1 样带 0.31 和 0.89,进一步印证了河漫滩湿地是反硝化菌群最理想的生境。

### 3.4 水生-湿生-陆生生境反硝化细菌群落的组装机制

长期以来,以物种配置(Species-sorting)或环境过滤(Environmental filtering)为代表的生态位理论在解释细菌群落生境异质性、 $\beta$ 多样性和群落组装机制方面占据主导地位<sup>[35-40]</sup>。Zhang 等<sup>[36]</sup>研究发现黄杆菌属(*Flavobacterium*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)存在于同一生境时相互竞争,*Flavobacterium* 比 *Pseudomonas* 生长快速,会优先占据营养丰富区,而假单胞菌属(*Pseudomonas*)由于竞争力弱被束缚在营养耗尽区。Yu 等<sup>[37]</sup>研究发现锡林河底泥及河砂中 *Flavobacterium* 更喜欢 pH 相对高、营养相对贫瘠的河砂,促进  $\text{CH}_4$  排放并抑制  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{CO}_2$  产生;而 *Hydrogenophaga* 更喜欢营养相对丰富的细粒,促进  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{CO}_2$  排放并抑制  $\text{CH}_4$  产生。这说明同一生境下微生物群落的组装(Community assembly)机制可能源于个体间的竞争,表现出某些个体对特定环境因子的嗜好,即生态位分化(Niche differentiation)理论<sup>[37-40]</sup>。本研究发现在任一生境中都存在特有菌群,说明生态位

分化理论在解释特定生境特有菌群分布方面具有说服力。

但本研究生境独有的反硝化菌丰度极低,可能是环境因子的重要性不足以让这些反硝化菌大量生长和繁殖所致。两种或三种生境共存的反硝化细菌属具有生态位重叠现象,符合群落组装的中性理论(Neutral theory)<sup>[38,41]</sup>,说明同一生境中共存的反硝化菌可能由于空间及资源共享、物种间的相互竞争,出现群落中所有个体相对丰度的高低差异。例如共存于水生、湿生、陆生生境的优势反硝化菌 *Flavobacterium*、*Pseudomonas* 和 *Hydrogenophaga* 因丰度差异均表现出对水生及湿生生境的偏好(1.65%–14.17%)和对陆生生境的偏离(0–0.07%)。

## 4 结论

通过反硝化菌资源库构建及高通量测序发现典型草原区锡林河流域分布着 36 个反硝化细菌属,表现出明显的生境异质性。反硝化细菌群落累积相对丰度沿水生-湿生-陆生梯度呈现先升高后降低的单峰空间分布趋势,并在河漫滩湿地样带达到峰值。黄杆菌属(*Flavobacterium*)、噬氢菌属(*Hydrogenophaga*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)等与 pH 值、水分及沙粒含量呈正相关关系,而芽孢杆菌属(*Bacillus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)等与粘粒、粉粒、有机质、总氮含量等呈正相关关系。低河漫滩样带是反硝化菌群最理想的栖息地,高河漫滩样带、河流中心样带和河床边缘样带是反硝化菌群较理想的生境,羊草(*Leymus chinensis*)样带和大针茅(*Stipa grandis*)样带不适合反硝化菌群的大量繁殖。

## REFERENCES

- [1] Qin P, Qi YC, Dong YS, et al. Soil nitrous oxide emissions from a typical semiarid temperate steppe in Inner Mongolia: effects of mineral nitrogen fertilizer levels and forms[J]. Plant and Soil, 2011, 342(1/2): 345-357
- [2] Čuhel J. The linkage between denitrification activity, N gas emissions, and the size of the denitrifier community in pasture

- soils[D]. České Budějovice: Doctoral Dissertation of University of South Bohemia, 2011
- [3] Shen Y, Chen WQ, Yang GW, et al. Can litter addition mediate plant productivity responses to increased precipitation and nitrogen deposition in a typical steppe[J]. *Ecological Research*, 2016, 31(4): 579-587
- [4] Sun PP, Zhuge YP, Zhang JB, et al. Soil pH was the main controlling factor of the denitrification rates and N<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O emission ratios in forest and grassland soils along the Northeast China Transect (NECT)[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2012, 58(4): 517-525
- [5] Mu SJ, Li JL, Yang HF, et al. Spatio-temporal variation analysis of grassland net primary productivity and its relationship with climate over the past 10 years in Inner Mongolia[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, 22(3): 6-15 (in Chinese)  
穆少杰, 李建龙, 杨红飞, 等. 内蒙古草地生态系统近10年NPP时空变化及其与气候的关系[J]. *草业学报*, 2013, 22(3): 6-15
- [6] Alikhani J, Al-Omari A, de CClippeleir H, et al. Assessment of the endogenous respiration rate and the observed biomass yield for methanol-fed denitrifying bacteria under anoxic and aerobic conditions[J]. *Water Science & Technology*, 2017, 75(1/2): 48-56
- [7] Guo LY, Shi F, Yang LY. Advances in functional genes and molecular ecology in denitrifiers[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(4): 583-590 (in Chinese)  
郭丽芸, 时飞, 杨柳燕. 反硝化菌功能基因及其分子生态学研究进展[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(4): 583-590
- [8] Chen HH, Mothapo NV, Shi W. The significant contribution of fungi to soil N<sub>2</sub>O production across diverse ecosystems[J]. *Applied Soil Ecology*, 2014, 73: 70-77
- [9] Fang JJ, Ma CM, Liu CF. The advance of study on denitrifying bacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 33(6E): 206-210,264 (in Chinese)  
方晶晶, 马传明, 刘存富. 反硝化细菌研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2010, 33(6E): 206-210,264
- [10] Guo GX, Deng H, Qiao M, et al. Effect of long-term wastewater irrigation on potential denitrification and denitrifying communities in soils at the watershed scale[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(7): 3105-3113
- [11] Qiu XF, Wang TW, Zhong XM, et al. Screening and characterization of an aerobic nitrifying-denitrifying bacterium from activated sludge[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012, 17(2): 353-360
- [12] Qu JH, Li HF, Yang JS, et al. *Flavobacterium cheniae* sp. nov., isolated from sediment of a eutrophic reservoir[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(Pt 9): 2186-2190
- [13] Angnes G, Nicoloso RS, da Silva MLB, et al. Correlating denitrifying catabolic genes with N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> emissions from swine slurry composting[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 140: 368-375
- [14] Abed RMM, Lam P, de Beer D, et al. High rates of denitrification and nitrous oxide emission in arid biological soil crusts from the Sultanate of Oman[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(9): 1862-1875
- [15] Zhong L, Du R, Ding K, et al. Effects of grazing on N<sub>2</sub>O production potential and abundance of nitrifying and denitrifying microbial communities in meadow-steppe grassland in northern China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 69: 1-10
- [16] Li J, Li B, Zhou Y, et al. A rapid DNA extraction method for PCR amplification from wetland soils[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 52(6): 626-633
- [17] Zhu DC, Tanabe SH, Yang C, et al. Bacterial community composition of South China Sea sediments through pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78501
- [18] Gamble TN, Betlach MR, Tiedje JM. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 33(4): 926-939
- [19] Zou YY, Zhang Y, Li MZ, et al. Isolation and identification of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its denitrification ability[J]. *China Environmental Science*, 2016, 36(3): 887-893 (in Chinese)  
邹艳艳, 张宇, 李明智, 等. 一株异养硝化-好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮活性研究[J]. *中国环境科学*, 2016, 36(3): 887-893
- [20] Zhou MH, Ye HR, Zhao XW. Isolation and characterization of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* KTB for bioremediation of wastewater[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2014, 19(2): 231-238
- [21] Shen ZZ, Wang DS, Ruan YZ, et al. Deep 16S rRNA pyrosequencing reveals a bacterial community associated with banana *Fusarium* wilt disease suppression induced by bio-organic fertilizer application[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e98420
- [22] Mwaikono KS, Maina S, Sebastian A, et al. High-throughput sequencing of 16S rRNA gene reveals substantial bacterial diversity on the municipal dumpsite[J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 145
- [23] Cao SB, Du R, Li BK, et al. High-throughput profiling of microbial community structures in an ANAMMOX-UASB reactor treating high-strength wastewater[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(14): 6457-6467
- [24] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969
- [25] Zhang SN, Zhao JR, Zhang XJ, et al. Planktonic bacterial community structure and its response to eutrophic factors in Lake ULanSuHai[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(6): 1082-1093 (in Chinese)  
张胜男, 赵吉睿, 张晓军, 等. 乌梁素海浮游细菌群落结构及其对富营养化因子的响应[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(6): 1082-1093
- [26] Kalvelage T, Lavik G, Lam P, et al. Nitrogen cycling driven by organic matter export in the South Pacific oxygen minimum zone[J]. *Nature Geoscience*, 2013, 6(3): 228-234
- [27] Parkin TB, Sexton AJ, Tiedje JM. Adaptation of denitrifying populations to low soil pH[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49(5): 1053-1056
- [28] Guo G, Wu D, Hao TW, et al. Denitrifying sulfur conversion-associated EBPR: the effect of pH on anaerobic metabolism and performance[J]. *Water Research*, 2017, 123: 687-695



- [29] Murray RE, Knowles R. Influence of pH on production and consumption of NO by slurries of an agricultural soil under denitrifying conditions[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 34(5): 357-362
- [30] Syväsalo E, Regina K, Pihlatie M, et al. Emissions of nitrous oxide from boreal agricultural clay and loamy sand soils[J]. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2004, 69(2): 155-165
- [31] Laverman AM, Zoomer HR, Verhoef HA. The effect of oxygen, pH and organic carbon on soil-layer specific denitrifying capacity in acid coniferous forest[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(4/5): 683-687
- [32] Zheng YL, Hou LJ, Lu M, et al. Community structure and spatial distribution of anaerobic ammonium oxidation bacteria in the sediments of Chongming eastern tidal flat in summer[J]. *Environmental Science*, 2012, 33(3): 992-999 (in Chinese)  
郑艳玲, 侯立军, 陆敏, 等. 崇明东滩夏季沉积物厌氧氨氧化菌群落结构与空间分布特征[J]. *环境科学*, 2012, 33(3): 992-999
- [33] Chiamonte JB, Roberto MDC, Pagioro TA. Seasonal dynamics and community structure of bacterioplankton in upper Paraná River floodplain[J]. *Microbial Ecology*, 2013, 66(4): 773-783
- [34] Michaud L, Caruso C, Mangano S, et al. Predominance of *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, and *Polaromonas* within the prokaryotic community of freshwater shallow lakes in the northern Victoria Land, East Antarctica[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 82(2): 391-404
- [35] Székely AJ, Langenheder S. The importance of species sorting differs between habitat generalists and specialists in bacterial communities[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 87(1): 102-112
- [36] Zhang W, Sileika T, Packman AI. Effects of fluid flow conditions on interactions between species in biofilms[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 84(2): 344-354
- [37] Yu JL, Fan YH, Gao XX, et al. Pyrosequencing analysis reveals abundance and community composition of denitrifying bacteria in Xilin river sludge[J]. *Advances in Microbiology*, 2014, 3(3): 70-78 (in Chinese)  
于景丽, 范雅慧, 高晓霞, 等. 高通量技术解析锡林河底泥反硝化菌群组成及丰度[J]. *微生物前沿*, 2014, 3(3): 70-78
- [38] Niu KC, Liu YN, Shen ZH, et al. Community assembly: the relative importance of neutral theory and niche theory[J]. *Biodiversity Science*, 2009, 17(6): 579-593 (in Chinese)  
牛克昌, 刘怿宁, 沈泽昊, 等. 群落构建的中性理论和生态位理论[J]. *生物多样性*, 2009, 17(6): 579-593
- [39] Leibold MA, McPeck MA. Coexistence of the niche and neutral perspectives in community ecology[J]. *Ecology*, 2006, 87(6): 1399-1410
- [40] Lambais MR, Lucheta AR, Crowley DE. Bacterial community assemblages associated with the phyllosphere, dermosphere, and rhizosphere of tree species of the atlantic forest are host taxon dependent[J]. *Microbial Ecology*, 2014, 68(3): 567-574
- [41] Philippot L, Bru D, Saby NPA, et al. Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(12): 3096-3104