

张亚平,阮晓红. 2012. 浅水湖泊(阳澄湖)沉积物氨氧化菌的分子证据[J]. 环境科学学报, 32(1):182-189

Zhang Y P, Ruan X H. 2012. Molecular evidence for ammonia oxidation bacteria in the sediments of shallow lake: A case study in Yangcheng Lake[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 32(1):182-189

浅水湖泊(阳澄湖)沉积物氨氧化菌的分子证据

张亚平,阮晓红*

南京大学地球科学与工程学院水科学系,南京 210093

收稿日期:2011-03-19 修回日期:2011-05-23 录用日期:2011-06-08

摘要:选择长江三角洲中型浅水湖泊——阳澄湖,应用分子生物学方法鉴定淡水系统底质中的厌氧氨氧化细菌和好氧氨氧化细菌. 试验设计三组厌氧氨氧化特异性巢式引物,对沉积物细菌的 16S rRNA 进行特异性扩增. 其中,引物对 AMX368f-AMX820r 从底质中扩增出了 anammox 特异性序列,系统发育分析表明样品序列分别与 *Candidatus brocadia fulgida*, *Candidatus brocadia anammoxidans* 和 *Candidatus scalindua* 属近似. 应用 amoA 基因特异性探针在底质中扩增出的好氧氨氧化菌序列,均属于 Betaproteobacteria. 本研究提供了阳澄湖中好氧氨氧化菌与厌氧氨氧化菌共存的分子证据.

关键词:厌氧氨氧化菌;生境条件;淡水系统;阳澄湖

文章编号:0253-2468(2012)01-182-08 中图分类号:X172 文献标识码:A

Molecular evidence for ammonia oxidation bacteria in the sediments of shallow lake: A case study in Yangcheng Lake

ZHANG Yaping, RUAN Xiaohong*

School of Earth Science and Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093

Received 19 March 2011; received in revised form 23 May 2011; accepted 8 June 2011

Abstract: Sediment samples were collected from Yangcheng Lake, a middle size shallow lake in Yangtze River Delta. Molecular biology methods were adopted to detect the anaerobic ammonia oxidation (anammox) and aerobic ammonia oxidation bacteria in the samples. Three pairs of nest PCR primers were designed to amplify the 16S rRNA from the sediment samples. The specified sequences of anammox were amplified by the primer pairs AMX368f-AMX820r, and analyses of phylogenetics showed that these sequences were similar to *Candidatus brocadia fulgida*, *Candidatus brocadia anammoxidans* and *Candidatus scalindua*. The sequences amplified by the amoA gene specified primer from the sediment samples belonged to the Betaproteobacteria class. This study provided the molecular evidence for coexistence of anammox and aerobic-ammonia-oxidation in Yangcheng Lake.

Keywords: anammox bacteria; habitat; freshwater system; Yangcheng Lake

1 引言 (Introduction)

传统理论认为,氨氧化过程是在好氧条件下, NH_4^+ 首先由氨单加氧酶(AMO)催化氧化成为羟氨,随后再由羟氨氧化还原酶催化氧化生成亚硝酸盐. 而最近的研究发现厌氧状态下也能进行氨氧化过程,厌氧氨氧化(anaerobic ammonia oxidation,

anammox)是在厌氧条件下由 anammox 菌驱动,以 NH_4^+ 为电子供体, NO_2^- 为电子受体,形成 N_2 的过程. 自然界中 anammox 活性的报道首先来自于波罗的海(Thamdrup *et al.*, 2002),在黑海首次鉴别了 anammox 菌(Kuypers *et al.*, 2003). 此后,在全球范围内的海洋环境(包括缺氧区,上升流区域,海湾,海岸和河口)(Dalsgaard *et al.*, 2003; Kuypers

基金项目:国家自然科学基金(No. 40573051);国家高技术研究发展计划(863)(No. 2008AA06Z031);水体污染控制与治理科技重大专项(No. 2009ZX07317-007-02);中央高校基本科研业务费重点项目培育计划(No. 1114020603)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 40573051), the Hi-Tech Research and Development Program of China (No. 2008AA06Z031), the Major Specialized Project for Control and Treatment of Water Pollution (No. 2009ZX07317-007-02) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 1114020603)

作者简介:张亚平(1985—),女,博士研究生, E-mail: applezhyp@gmail.com; * 通讯作者(责任作者), E-mail: ruanxh@nju.edu.cn

Biography: ZHANG Yaping (1985—), female, Ph. D. candidate, E-mail: applezhyp@gmail.com; * **Corresponding author**, E-mail: ruanxh@nju.edu.cn

et al., 2005; Rich *et al.*, 2008; Trimmer *et al.*, 2003; Woebken *et al.*, 2007) 等环境中也发现了 anammox 菌. 除了海洋系统, Schubert 等 (Schubert *et al.*, 2006) 首次在世界第二大淡水湖——Tanganyika 湖中发现 anammox 菌, 并测算出每年由于 anammox 作用产生的 N_2 约 0.2 Tg, 约占氮去除总量的 13%. 已检测到 anammox 菌的淡水环境包括: 深水湖泊厌氧水体 (Schubert *et al.*, 2006), 超富营养化湖泊沉积物 (Penton *et al.*, 2006), 河流沉积物 (Zhang *et al.*, 2007), 多孔含水层 (Costello *et al.*, 2009), 热泉 (Jaeschke *et al.*, 2009) 等. 已在淡水环境中鉴别出的 anammox 种群主要有, *Candidatus scalindua brodae*, *Candidatus scalindua sorokinii*, *Candidatus scalindua wagneri*, *Candidatus brocadia fulgida*, *Candidatus brocadia anammoxidans* 和 *Candidatus kuenenia stuttgartiensis*.

有研究报告 (Schmidt *et al.*, 2003), 好氧氨氧化菌和厌氧氨氧化菌可以在兼性环境中共存. 一方面, 好氧氨氧化菌的代谢过程消耗氧气并产生 NO_2^- , 为厌氧氨氧化菌营造厌氧环境的同时提供反应底物; 另一方面, 好氧氨氧化菌和厌氧氨氧化菌存在对电子受体氨氮的竞争. 环境中好氧氨氧化菌和厌氧氨氧化菌竞争共存, 是氮素循环的重要驱动力.

长江三角洲河网密布, 湖荡众多, 且大多为浅

水湖泊. 湖泊底泥的好氧厌氧界面上存在适合氨氧化菌生存的兼性环境. 徐徽等 (2009) 发现太湖梅梁湾沉积物中 anammox 作用占整个脱氮作用的 10% 以上. 阳澄湖位于在太湖以北的长江三角洲上, 面积约 120 km^2 , 其 65% 的底质表层分布着斑块状的粉砂和砂质泥. 近年来由于养殖的需要, 投入了大量饲料, 水体中营养物质不断增加. 应用分子生物学手段鉴别阳澄湖沉积物中好氧及厌氧氨氧化微生物的存在, 探讨氨氧化微生物与环境因子之间的关系, 为长江三角洲地区水体中氮素循环研究提供依据.

2 材料和方法 (Materials and methods)

2.1 样品采集

分别于 2009 年 7 月 (夏季)、2009 年 10 月 (秋季) 和 2010 年 1 月 (冬季)、2010 年 6 月 (春夏季) 采集阳澄湖沉积物和相应的上覆水样品, 样品采集位置见图 1. 用抓泥斗抓取表层 (0 ~ 10 cm) 的沉积物, 每个底质样品混匀后分成两份. 其中, 1 份装入灭菌离心管, 立即放入液氮罐中, 运回实验室 -60 $^{\circ}C$ 冻存, 用于微生物鉴定; 另 1 份样品用于常规理化指标分析; 沉积物经离心后得孔隙水. 用纳氏试剂分光光度法测氨氮, 重量差减法测含水率, 以 550 $^{\circ}C$ 下 2 h 后的重量差测得烧失量. 采样点上覆水、孔隙水及沉积物理化性质如表 1 所示.

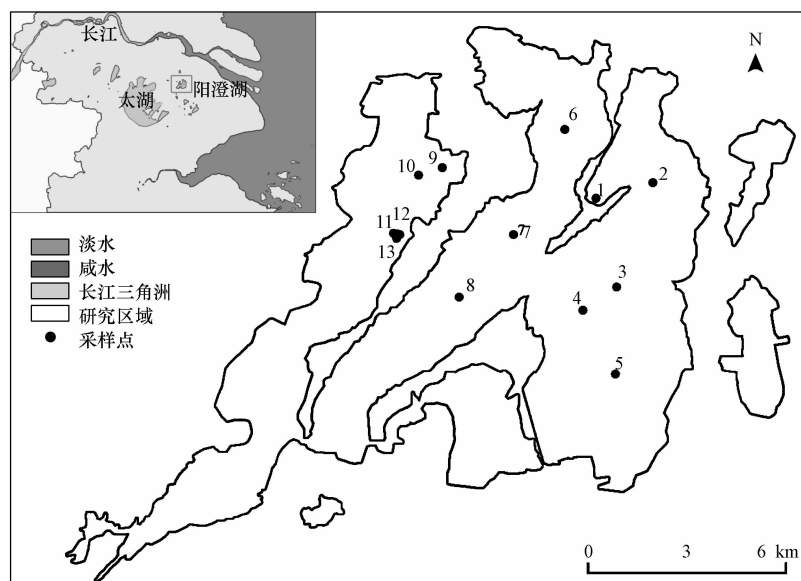


图 1 采样点位置分布图

Fig. 1 Sampling sites in this study

表 1 采样点物理化学特征

Table 1 Characteristics of the sample sites

点位	采集时间	DO /(mg·L ⁻¹) ^a	pH ^a	T ^a / °C	NH ₄ ⁺ -N ^b /(mg·L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ -N ^b /(mg·L ⁻¹)	NO ₂ ⁻ -N ^b /(mg·L ⁻¹)	TOC ^b /(mg·L ⁻¹)	含水率 ^c	烧失量 ^c
1	2010-01-20	11.16	7.11	9.0	16.19	0.34	0.11	56.63	60.1%	3.9%
2	2009-10-20	9.95	8.56	19.7	7.35	0.55	0.04	15.07	54.0%	5.4%
3	2009-10-20	8.18	8.11	19.8	33.71	0.42	0.03	51.39	62.3%	7.8%
4	2010-06-20	10.54	7.16	27.5	8.11	3.27	0.16	34.89	72.9%	9.1%
5	2009-07-22	6.94	8.40	31.6	7.79	0.53	0.02	68.75	73.2%	5.5%
6	2010-06-20	11.42	7.85	27.7	15.93	0.08	0.20	31.09	67.1%	8.7%
7	2009-10-20	9.18	8.19	20.2	15.89	0.58	0.06	44.18	63.1%	7.2%
8	2010-01-20	10.90	7.30	8.8	22.19	0.09	0.04	40.06	76.0%	7.8%
9	2010-01-20	9.61	7.18	8.2	20.44	0.31	0.11	134.31	62.8%	4.1%
10	2009-10-20	10.98	8.82	19.9	6.50	0.69	0.07	48.28	72.8%	9.3%
11	2009-10-20	9.88	8.57	20.4	20.49	0.58	0.06	29.77	71.6%	9.9%
12	2010-01-20	10.30	7.34	8.3	12.34	0.17	0.08	48.77	71.5%	4.9%
13	2010-06-20	8.03	7.38	27.3	13.35	1.06	0.14	32.21	71.2%	10.0%
	最小值	6.94	7.11	31.60	6.50	0.08	0.02	15.07	76.00%	3.9%
	最大值	11.42	8.82	8.20	33.71	3.27	0.20	134.31	54.00%	10.0%
	平均值	9.77	7.84	19.11	15.41	0.67	0.09	48.88	67.58%	7.0%

注:a:上覆水; b:孔隙水; c:沉积物。

2.2 DNA 提取 (Purkhold *et al.*, 2000)

称取 1.0 g 沉积物样品,加入 675 μL DNA 提取缓冲液(100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS,100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA,0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl,1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl,1% CTAB,PH 8.0),温和混匀,加入 25 μL 蛋白酶 K(20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 60 min. 加入 75 μL 的 20% SDS(W/V),65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h,每隔 15~20 min 上下颠倒混匀一次.5000 g 离心 10 min 后,上清液转移至干净离心管中. 加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混匀. 离心 5 min,上清液转移至干净的离心管中. 加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)混匀,5000 g 离心 5 min 后,将上清液转移至干净的离心管中. 酚氯仿的抽提过程重复操作两次. 加入 0.6 体积的预冷的异丙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀过夜. 12000 g 离心 15 min,弃上清液,用 70% 冰乙醇清洗两次. 样品重悬于 50 μL 的灭菌去离子水中,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

2.3 PCR 扩增、序列测定、系统发育分析

应用通用引物 1392r 与浮霉菌门通用型引物 PLA46f 组合对细菌的 16S rRNA 进行扩增,对扩增出的 16S rRNA 应用 anammox 菌特异性引物 AMX368f、AMX368r、AMX820r 进行巢式扩增. 应用细菌通用引物 An27f-An1492r 对细菌的 16S rRNA 进行扩增,应用氨氧化基因特异性探针 amoA1f-amoA2r 进行巢式扩增. 扩增过程中涉及到的引物以

及相关参数详见表 2.

50 μL 的 PCR 反应体系中,分别包含 5 μL 的 10 \times PCR buffer,4 μL 的 dNTP Mixture(各 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),3 μL 的 MgCl_2 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),0.25 μL 的 Taq 酶(5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)(Takara),引物各 2 μL (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),加入 2 μL 稀释 100 倍(Zhou *et al.*,1996)后的 DNA 粗提液(约 10~100 ng)作为反应模板.

P1、P2 的反应体系:首先在 94 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,预变性 4 min,以 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, T_a 值温度下退火 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min,作 28 个循环,再以 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min.

P3 的反应体系:首先在 95 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,预变性 5 min,以 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, T_a 值温度下退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,作 35 个循环,再以 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 将第一轮扩增反应得到的目的片段条带用琼脂糖凝胶试剂盒(TIANGEN)切割提纯后再作为模板进行第二轮扩增.

将第一轮扩增反应得到的目的片段条带切出用琼脂糖凝胶试剂盒(TIANGEN)提纯后再作为模板进行第二轮扩增.

将 PCR 扩增出的目的片段送南京金思瑞公司进行克隆测序. 目的序列连接到 T 载体后,转化到 E. coli 质粒中,从每个 PCR 产物克隆后,随机挑选出三个克隆子进行测序. 测得的序列经 BioEdit 3.0

编辑后,提交 GenBank 数据库. 在 NCBI 的核酸序列数据库中运用 BLAST 进行序列比对,下载相似序列的 FASTA 文件. 运用 ClustalX 2.0 对序列进行比对

排序,在 MEGA 4.0 中导入已排序的文件,以 N-J 法建立系统发育树.

表 2 实验中所用引物对

Table 2 PCR Primers used in this study

体系	参考文献	引物	序列	$T_a^a / ^\circ\text{C}$	
P1	Sanchez-Melsio <i>et al.</i> , 2009, Modified	first round	PLA46f	5'-GGA TTA GGC ATG CAA GTC-3'	59
			1392r	5'-GAC GGG CGG TGT GTA CAA-3'	
		second round	AMX368f	5'-TTC GCA ATG CCC GAA AGG-3'	59 ~ 62
			AMX820r	5'-AAA ACC CCT CTA CTT AGT GCC C-3'	
P2	Rich <i>et al.</i> , 2008	first round	PLA46f	5'-GGA TTA GGC ATG CAA GTC-3'	59
			1392r	5'-GAC GGG CGG TGT GTA CAA-3'	
		second round	PLA46f	5'-GGA TTA GGC ATG CAA GTC-3'	62
			AMX368r	5'-CCT TTC GGG CAT TGC GAA-3'	
P3	Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997	first round	An27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	52
			An1492r	5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	
		second round	amoA1f	5'-GGGGTTTCTACTGCTGGT-3'	60
			amoA2r	5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3'	

注: a: T_a 为引物对的退火温度.

研究获得的阳澄湖序列已存入 GenBank 中,序列号如下: anammox 特异性序列登记号为 GQ504007、GQ504008, GU188978 ~ GU188983, JF261054 ~ JF261088; amoA 特异性序列登记号为 JF975652 ~ JF975680.

3 结果与讨论 (Results and discussion)

3.1 Anammox 特异性序列的系统发育分析

在所有采样点中,引物对 AMX368f-AMX820r 均扩增出长度约为 470 bp 左右的 anammox 特异性片段,建立的系统发育树见图 2. 样品中的大多数序列与 *Candidatus brocadia fulgida* 的序列相似性大于 97%. 3 条序列与 *Candidatus brocadia* anammoxidans 的序列相似性大于 95%. 来自于 9 号采样点的 1 条序列与 *Candidatus scalindua* 序列相似性为 95%, 4 条序列与 uncultured planctomycete 序列比较相近,与 anammox 菌序列的相似性仅为 85%.

引物对 PLA46f-AMX368r 也能扩增出长度约为 340 bp 左右的目的条带,但 BLAST 结果表明,这些序列与已知 anammox 菌的序列相似性不高,与之最为接近的已知序列属于 *Verrucomicrobia* 中的一些未培养细菌. Rich 等 (2008) 以 PLA46f-AMX368r 为引物在 Chesapeake 湾中扩增出了 anammox 特异性片段,而 Sanchez 等 (Sanchez-Melsio *et al.*, 2009) 用这对引物对淡水底质的样品进行分析时发现,其所得的序列也主要落在 *Verrucomicrobia* 目内. 可能是

因为引物对中浮霉菌通用引物 PLA46f 降低了引物对的特异性.

厌氧氨氧化菌属 *Candidatus brocadia* 在已鉴别出的 5 个种属的 anammox 菌中分布最为广泛,鉴别的存在环境包括:海洋,淡水、地下水环境及不同接种源的 anammox 反应器. 在 9 号点采集的沉积物中发现了一条来自 *Candidatus scalindua* 的序列,而 *Candidatus scalindua* 是海洋环境中的主要类群 (Pratscher *et al.*, 2009).

3.2 AmoA 基因序列的系统发育分析

AmoA 特异性引物对 amoA1f-amoA2r 扩增出的目的条带片段长度约为 490 bp,所得序列的建立的系统发育分析树见图 3. 获得的序列均来自于 *Betaproteobacteria*. 4 条序列与 E73 和 E35 的序列相似性达 97% 以上,这两个 amoA 基因片段来自湖泊底质的 uncultured bacteria,与 *Nitrosomonas aestuarii* 属最为接近. 与其余最为接近的已知序列来自 *Nitrosomonas oligotropha* 属.

自养好氧氨氧化菌 (AOB) 一直被认为是氨氧化作用的主要菌群 (Otte *et al.*, 1999), 好氧氨氧化菌群主要属于 *Betaproteobacteria* (包括 *Nitrosomonas* 和 *Nitrosospira*) 和 *Gammaproteobacteria* (*Nitrosococcus*). 其中, *Nitrosomonas* 和 *Nitrosospira* 是自然系统中的优势好氧氨氧化菌群 (Nold *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002; Whitby *et al.*, 1999) 本研究所得的主要序列

与好氧氨氧化的主要菌群并不一致. 研究中采用了氨单加氧酶特异性引物, 吴宇澄等 (2010) 研究表明, 该引物对敏感性较高而特异性较低, 拟在后续

的研究中采用 CTO 引物对该地的好氧氨氧化菌进行分子生态学研究.

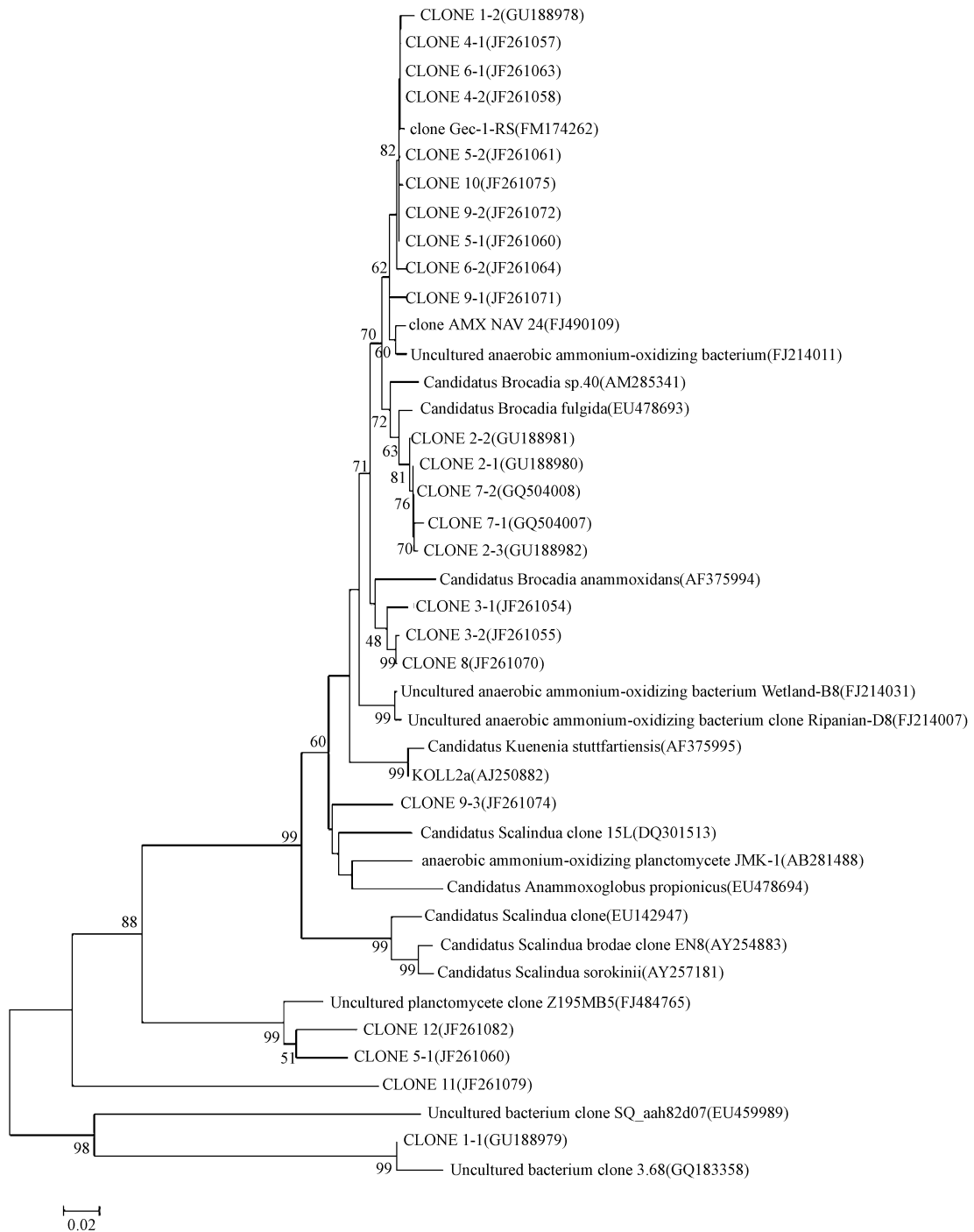


图 2 引物对 AMX368f-AMX820r 扩增所得序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees showing the affiliations phylotypes using primer pair AMX368f-AMX820r

Third, Schmid, Sliemers 等 (Schmidt *et al.*, 2003; Sliemers *et al.*, 2003; Third *et al.*, 2001) 在氧限制反应器中的好氧/厌氧界面发现 anammox 菌与好氧氨

氧化菌 (aerobic ammonia oxidation bacteria, AOB) 同时存在. Zhang 等 (2007) 在新沂河的底泥中同时检测到好氧氨氧化菌和厌氧氨氧化菌, 向燕等 (2010)

对太湖的氨氧化菌的垂直分布与多样性的研究表明,氨氧化细菌和氨氧化古菌共存于沉积物各层,

但在沉积物各层均未发现典型厌氧氨氧化细菌的 16S rRNA 基因序列.

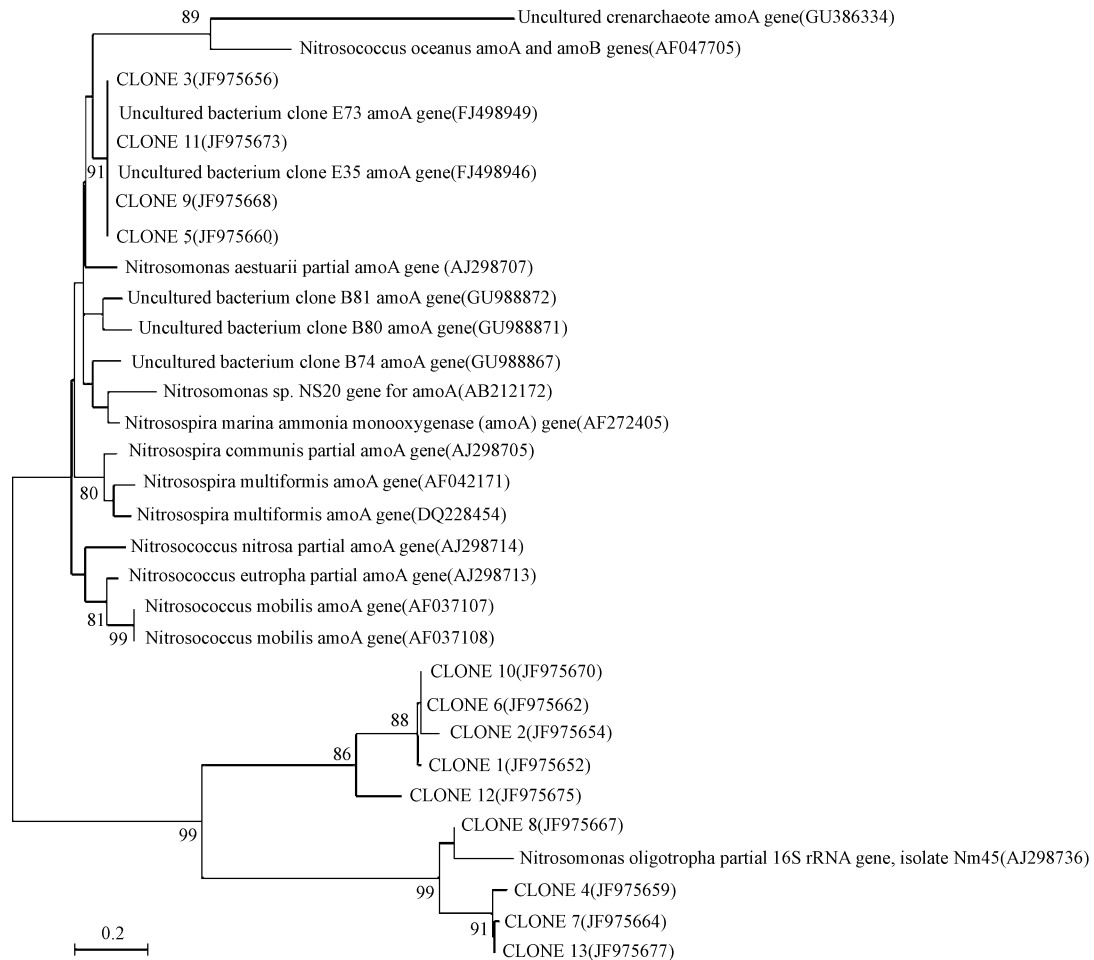


图3 引物对 *amoA1f-amoA2r* 所得序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic trees showing the affiliations phylotypes using primer set *amoA1f-amoA2r*

3.3 底泥环境特征分析

对阳澄湖东、中、西湖 4 个季节的样品理化特征分析表明,沉积物孔隙水中的氨氮最大含量为 $33.71 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,平均值为 $15.41 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,亚硝酸盐氮含量最大值为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,平均值为 $0.09 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,有机碳含量最大值 $134.31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,平均值为 $48.88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.张彦等(2010)对太湖沉积物及孔隙水中氮的时空分布特征进行了调查研究,孔隙水中的氨氮最高值出现在北部湖区的竺山湾和梅梁湾,北部湖区底质孔隙水氨氮浓度为 $5.81 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,最大值为 $7.88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.徐徽等(2009)应用 ^{15}N 同位素示踪法对太湖梅梁湾水土界面厌氧氨氧化过程进行了研究,结果表明,anammox 过程占整个脱氮过程的比率均超过 10%,但未见厌氧氨氧化菌的分子生物学证据报道.向燕等(2010)采用

AMX368f-AMX820r 引物对未发现太湖底泥中存在典型的 anammox 菌.与太湖相比,阳澄湖底泥孔隙水中的氨氮浓度平均浓度较高,约为其 3 倍.据此推测阳澄湖中的 anammox 活性可能会高于太湖.对于阳澄湖底泥中不同环境条件下氨氧化菌的群落结构变化、分子生态学和厌氧氨氧化对脱氮过程的贡献需进一步研究.

4 结论(Conclusions)

1) PLA46f、AMX368r、AMX368f 和 AMX820r 这 4 条引物被广泛应用于 anammox 菌的分子生物学鉴定.本研究中,引物对 AMX368f-AMX820r 比 PLA46f-AMX368r 扩增出的序列的特异性高.

2) 在阳澄湖底泥中检测到了 anammox 菌的序列,是该地区关于 anammox 分子证据的首次报道.

3) 阳澄湖底泥中 anammox 菌与 AOB 同时存在, 有关 anammox 的种群分布和环境因子之间的关系还需进一步进行研究。

致谢 (Acknowledgements): 感谢中国药科大学张玉彬老师在分子生物学实验中给予了热心的指导与建议。感谢那雅因、孙翰、吕学研、潘扎荣和周晓海在样品采集和分析过程中给予的帮助。

责任作者简介: 阮晓红 (1961 —), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为污染物迁移转化规律及污染水体生态修复, E-mail: ruanxh@nju.edu.cn.

参考文献 (References):

- Costello D M, Lamberti G A. 2009. Biological and physical effects of non-native earthworms on nitrogen cycling in riparian soils [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 41(10): 2230-2235
- Dalsgaard T, Canfield D E, Petersen J, *et al.* 2003. N₂ Production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica [J]. *Nature*, 422(6932): 606-608
- Jaesche A, Den Camp H, Harhangi H, *et al.* 2009. 16S rRNA gene and lipid biomarker evidence for anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (anammox) in California and Nevada hot springs [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 67(3): 343-350
- Kuypers M M M, Lavik G, Woecklen D, *et al.* 2005. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(18): 6478-6483
- Kuypers M M M, Sliemers A O, Lavik G, *et al.* 2003. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea [J]. *Nature*, 422(6932): 608-611
- Nold S C, Zhou J Z, Devol A H, *et al.* 2000. Pacific northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the beta subdivision of the Proteobacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10): 4532-4535
- Otte S, Schalk J, Kuenen J G, *et al.* 1999. Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer *Alcaligenes faecalis* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(2): 255-261
- Park H D, Regan J M, Noguera D R. 2002. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacterial populations in aerated-anoxic Orbital processes [J]. *Water Science and Technology*, 46(1/2): 273-280
- 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10): 6829-6832
- Pratscher J, Stichternoth C, Fichtl K, *et al.* 2009. Application of recognition of individual genes-fluorescence in situ hybridization (RING-FISH) to detect nitrite reductase genes (*nirK*) of denitrifiers in pure cultures and environmental samples [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3): 802-810
- Purkhold U, Pommerening-Roser A, Juretschko S, *et al.* 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12): 5368-5382
- Rich J J, Dale O R, Song B, *et al.* 2008. Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) in Chesapeake Bay sediments [J]. *Microbial Ecology*, 55(2): 311-320
- Rothauwe J H, Witzel K P, Liesack W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12): 4704-4712
- Sanchez-Melsio A, Caliz J, Balaguer M D, *et al.* 2009. Development of batch-culture enrichment coupled to molecular detection for screening of natural and man-made environments in search of anammox bacteria for N-removal bioreactors systems [J]. *Chemosphere*, 75(2): 169-179
- Schmidt I, Sliemers O, Schmid M, *et al.* 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater [J]. *Fems Microbiology Reviews*, 27(4): 481-492
- Schubert C J, Durisch-Kaiser E, Wehrli B, *et al.* 2006. Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika) [J]. *Environmental Microbiology*, 8(10): 1857-1863
- Sliemers A O, Third K A, Abma W, *et al.* 2003. CANON and Anammox in a gas-lift reactor [J]. *Fems Microbiology Letters*, 218(2): 339-344
- Thamdrup B, Dalsgaard T. 2002. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3): 1312-1318
- Third K A, Sliemers A O, Kuenen J G, *et al.* 2001. The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: Interaction and competition between three groups of bacteria [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(4): 588-596
- Trimmer M, Nicholls J C, Deflandre B. 2003. Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames estuary, United Kingdom [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11): 6447-6454
- Whitby C B, Saunders J R, Rodriguez J, *et al.* 1999. Phylogenetic differentiation of two closely related *Nitrosomonas* spp. that inhabit different sediment environments in an oligotrophic freshwater lake [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11): 4855-4862
- Woecklen 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14): 4648-4657
- 吴宇澄, 王建军, 吴庆龙. 2010. 基于引物的湖泊沉积物氨氧化细菌 PCR 扩增策略比较 [J]. *环境科学*, 31(9): 2178-2183
- Wu Y C, Wang J J, Wu Q L. 2010. Comparative Analysis of Primer-based PCR Strategies for Characterizing Ammonia-oxidizing Bacterial

- Communities in Lake Sediments [J]. *Environmental Science*, 31 (9):2178-2183 (in Chinese)
- 向燕,吴宇澄,刘国峰,等. 2010. 太湖竺山湾沉积物中氨氧化原核生物的垂直分布与多样性[J]. *生态学报*,30(6):1423-1430
- Xiang Y, Wu Y C, Liu G F, *et al.* 2010. Vertical distribution and diversity of ammonia-oxidizing prokaryotes in a sediment core from Zhushan Bay, Lake Taihu[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 30(6):1423-1430 (in Chinese)
- 徐徽,张路,商景阁,等.2009. 太湖梅梁湾水土界面反硝化和厌氧氨氧化[J]. *湖泊科学*,21(6):775-781
- Xu H, Zhang L, Shang J G, *et al.* 2009. Denitrification and anammox on the sediment-water interface in the Meiliang Bay of Lake Taihu [J]. *Journal of Lake Sciences*, 21(6):775-781 (in Chinese)
- 张彦,张远,于涛,等.2010. 太湖沉积物及孔隙水中氮的时空分布特征[J]. *环境科学研究*,23(11):1333-1342
- Zhang Yan, Zhang Y, Yu T, *et al.* 2010. Spatial and temporal distribution of nitrogen species in sediment and interstitial waters of Taihu Lake [J]. *Research of Environmental Sciences*, 23 (11): 1333-1342 (in Chinese)
- Zhang Y, Ruan X H, Den Camp H, *et al.* 2007. Diversity and abundance of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater sediments of the Xinyi River (China) [J]. *Environmental Microbiology*, 9(9): 2375-2382
- Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2): 316-322