



红壤地下水厌氧氨氧化菌分布特征及环境响应

毛艳^{1,2}, 郎锋祥^{1,2*}, 张洁^{2,3}, 班磊^{1,2}, 徐鹏^{1,2}, 肖莹洁^{1,2}, 邹武^{1,2}, 邹晓焰^{1,2}

- 1 赣江中游水文水资源监测中心, 江西 吉安 343000
- 2 鄱阳湖水文生态监测研究重点实验室, 江西 南昌 330000
- 3 修河水文水资源监测中心, 江西 九江 332000

毛艳, 郎锋祥, 张洁, 班磊, 徐鹏, 肖莹洁, 邹武, 邹晓焰. 红壤地下水厌氧氨氧化菌分布特征及环境响应[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 1735-1746.

MAO Yan, LANG Fengxiang, ZHANG Jie, BAN Lei, XU Peng, XIAO Yingjie, ZOU Wu, ZOU Xiaoyan. Distribution characteristics and environmental responses of anammox bacteria in groundwater of red soil areas[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(6): 1735-1746.

摘要: 【目的】进一步了解红壤区地下水中厌氧氨氧化菌群落结构分布规律及其生态功能差异化机制。【方法】以酸性红壤地下水为研究对象, 结合理化指标和微生物高通量测序技术, 研究吉安市地下水中微生物群落结构和厌氧氨氧化菌的分布规律及其影响因子。【结果】11个地下水研究点中, 氮含量超标点位有3个, 超标率达27.3%; 仅有2个站点的水质符合《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2022)要求, 超标率达81.8%。地下水中厌氧氨氧化菌广泛存在, 11个样品的厌氧氨氧化细菌 *hzsB* 基因拷贝数在 3.67×10^4 – 6.62×10^8 copies/g, 与其他生态系统相比, 红壤地下水厌氧氨氧化菌功能基因拷贝数更高, 说明地下水环境特性更适合厌氧氨氧化细菌生长代谢。每个点位均检测出厌氧氨氧化菌的4个属: *Candidatus Brocadia* 为优势菌属, 平均丰度值为62.47%, *Candidatus Scalindua* 平均丰度值为17.44%, *Candidatus Jettenia* 平均丰度值为14.41%, *Candidatus Kuenenia* 平均丰度值为5.67%。相关性分析表明, 厌氧氨氧化菌基因丰度与氨氮、锰、氯化物相关性显著, 可见地下水中氨氮、锰、氯化物含量的升高可能会增强厌氧氨氧化菌的活性及丰度。【结论】本研究结果突出了厌氧氨氧化菌对红壤地下水元素地球化学生物循环的重要价值, 可为我国红壤区地下水污染的生物防治技术的研究提供基础资料。

关键词: 红壤地下水; 微生物多样性; 氮分布; 厌氧氨氧化菌; 高通量测序

资助项目: 江西省水利厅 2023 年度水利科技项目(202324YBKT14)

This work was supported by the Water Conservancy Technology Project of Jiangxi Provincial Water Resources Department in 2023 (202324YBKT14).

*Corresponding author. E-mail: jaszck@126.com

Received: 2023-12-21; Accepted: 2024-03-21; Published online: 2024-03-26

Distribution characteristics and environmental responses of anammox bacteria in groundwater of red soil areas

MAO Yan^{1,2}, LANG Fengxiang^{1,2*}, ZHANG Jie^{2,3}, BAN Lei^{1,2}, XU Peng^{1,2}, XIAO Yingjie^{1,2}, ZOU Wu^{1,2}, ZOU Xiaoyan^{1,2}

1 Hydrology and Water Resources Monitoring Center of the Middle Reaches of Ganjiang River, Ji'an 343000, Jiangxi, China

2 Key Laboratory of Poyang Lake Hydrology and Ecology Monitoring and Research, Nanchang 330000, Jiangxi, China

3 Hydrology and Water Resources Monitoring Center of the Middle Reaches of Xiuhe River, Jiujiang 332000, Jiangxi, China

Abstract: [Objective] To further understand the community structure, distribution, and ecological function differentiation mechanism of anammox bacteria in the groundwater of red soil areas. [Methods] We employed physical and chemical tests and high-throughput sequencing to study the microbial community structure, distribution of anammox bacteria, and their influencing factors in the groundwater of Ji'an. [Results] The nitrogen content exceeded the limit at three sites among the 11 groundwater sampling sites, with an over-limit rate of 27.3%. The water quality of only two sites met the requirements of the Standard for Drinking Water Quality (GB 5749—2022), which indicated an over-limit rate of 81.8%. Anammox bacteria presented wide distribution in groundwater, and the abundance of *hzsB* gene in the 11 samples ranged from 3.67×10^4 copies/g to 6.62×10^8 copies/g. Compared with other habitats, the groundwater in red soil areas showed increased copy number of functional genes of anammox bacteria, which indicated that the environmental characteristics of groundwater were more suitable for the growth and metabolism of anammox bacteria. Four genera of anammox bacteria were detected at each site. Specifically, *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Scalindua*, *Candidatus Jettenia*, and *Candidatus Kuenenia* showed the average abundance of 62.47%, 17.44%, 14.41%, and 5.67%, respectively. The correlation analysis suggested that the gene abundance of anammox bacteria was significantly correlated with ammonia nitrogen, manganese, and chloride, which indicated that the increases in ammonia nitrogen, manganese, and chloride in groundwater may enhance the activity and abundance of anammox bacteria. [Conclusion] The results of this study highlight the importance of anammox bacteria in the geochemical and biological cycling of elements in the groundwater of red soil areas, which will provide basic data for the bioremediation of groundwater pollution in the red soil areas of China.

Keywords: groundwater of red soil areas; microbial diversity; distribution of nitrogen; anammox bacteria; high-throughput sequencing

氮素是维持生命体征正常生长的基本元素,但现代工农业发展将大量的含氮化合物带入环境,红壤区地下水氮含量呈上升趋势^[1]。地下水环境中,氮素主要以离子态的氨氮、硝酸盐氮、亚硝酸盐形式存在,即常称为的“三氮”,“三氮”污染会引起地下水水质下降、适用性降低,破坏水-岩平衡,还会以直接或间接的方式危害人体健康^[2-5]。目前,江西省仍有相当比例的人口直接以地下水为饮用水源,大多分布于广大的农村地区。红壤地区农村地下水“三氮”污染对当地村民的身体健康产生威胁。微生物降解一直被认为是氮素去除的主要途径,传统微生物降解主要由硝化和反硝化过程实现^[6]。厌氧氨氧化是近年来氮循环研究的重大发现^[7-8]。厌氧氨氧化是指厌氧氨氧化菌在厌氧环境中以氨氮为电子供体、亚硝态氮为电子受体生成氮气的过程^[9]。厌氧氨氧化菌为自养型厌氧菌,该菌生长缓慢,至今未能通过传统的微生物分离培养方法实现纯培养^[10]。应用分子生物学技术,则可克服传统微生物生态研究的局限性,最大限度获取微生物的遗传信息,从而全面地分析样品的微生物多样性。Fu 等^[11]通过 16S rRNA 基因测序技术研究珠江口表层沉积物中厌氧氨氧化菌群落结构,发现厌氧氨氧化菌的种类、分布与上覆水的盐度、温度、pH 值、碳氮比(C/N)等环境因素密切相关。Qin 等^[12]通过荧光定量 PCR 检测 *hzsB* 基因的丰度,发现在富营养化湖水的不同位点,厌氧氨氧化菌的丰度及群落结构也不同。前期的研究表明,厌氧氨氧化菌在自然生态环境中广泛存在^[1,13-14]。由于科学认知等原因,研究对象主要集中于人工培养反应器、海洋、湿地、土壤、地表水等领域,识别和研究酸性红壤区地下水生境中厌氧氨氧化菌多样性分布的研究报道甚少。

红壤是我国南方典型土壤类型,与其他类型土壤相比,呈酸性且盐基具有高度不饱和性的铁铝土。其主要特征是缺乏碱金属与碱土金属,而富含铁、铝氧化物,呈酸性红色^[15]。此外,红壤区多为粮食主产区,土壤及地下水的物质组成受耕作所使用的大量肥料影响较大。前期,本研究团队选取了江西省吉安市部分地区,对当地地下水 2013–2022 年这十年间的跟踪调查发现,水质呈弱酸性,pH 值为 6.0 左右,“三氮”含量处于较高水平。通过研究酸性红壤地下水中厌氧氨氧化菌的多样性分布及群落结构组成情况,将可能为氮污染地下水的生物修复研究提供参考依据,并有望为我国酸性红壤地下水微生物生态系统的深入研究及氮素的污染防治提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

吉安市(25°58′–27°57′N, 113°46′–115°56′E)位于江西省中西部,西接湖南省,处于赣江中游段,地处我国红壤分布区的中心地带,具有典型代表性。吉安市境内溪流河川、水系网络酷似叶脉,赣江自南向北贯穿整个中部,将全市切割为东西两大部分。吉安市地势由边缘山地到赣江河谷,徐徐倾斜,逐级降低,往北方逐渐平坦。吉安市北部为赣抚平原,中间为吉泰平原,呈现一种不对称的盆地形式,成为吉泰盆地的主要组成部分。在吉泰盆地边缘分布有石炭纪、二叠纪、泥盆纪地层。岩性以碎屑岩为主以及少量碳酸盐岩类,局部有脉状或层状产出的玄武岩类^[16]。评价区内地下水有松散岩类孔隙水、红色碎屑岩类溶隙裂隙水、碳酸盐岩类裂隙溶洞水和构造裂隙水 4 种基本类型^[17]。补给来源主要为大气降水、河流入渗、

灌期稻田水的渗入，排泄方式主要以蒸发、侧向径流和人工开采为主。

在分析了研究区域地质背景、水文地质条件、人类活动影响及野外调查的基础上，兼顾采样的可行性和代表性，本研究在吉安市境内选取 11 个采样点，分别为吉福(JF)、天玉(TY)、桥南小学(QNXX)、值夏(ZX)、永新(YX)、遂川(SC)、永丰(YF)、茨坪(CP)、泰和(TH)、小溪(XX)和巴邱(BQ)。2023 年全年按照每季度一次的频率采集地下水样品进行检测分析。采样点基本信息如表 1 所示。

1.2 地下水理化指标分析

本研究采用现场监测和实验室检测相结合的方式对地下水样品的理化指标进行测定。现场监测使用便携式现场监测仪(HACH 公司)，对水温、pH 值、电导率(electrical conductivity, EC)等现场监测项目进行监测。实验室检测项目选择氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、硝酸盐氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)、亚硝酸盐氮($\text{NO}_2^-\text{-N}$)、高锰酸盐指数(COD_{Mn})、铁(Fe)、锰(Mn)、铝(Al)、氟化物(F^-)、氯化物(Cl^-)、硫酸盐(SO_4^{2-})等为基本理化指标进行检测^[18-19]。

1.3 样品 DNA 提取

将采集到灭菌袋中的地下水样进行减压过滤，样品的生物信息截留在 0.22 μm 微孔滤膜上。将滤膜剪碎之后采用磁珠法土壤 DNA 提取试剂盒[方舟生物安全科技(广州)有限公司]提取样品中的总 DNA，并用 NanoDrop One (Thermo 公司)检测 DNA 的纯度和浓度。

1.4 PCR 扩增 16S rRNA 基因

以基因组 DNA 为模板，选用细菌 16S rRNA 基因 V4 区通用引物 515F (5'-GTGCCAGCMG CCGCGGTAA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGG GTWTCTAAT-3')对样品进行 PCR 扩增^[20-21]。PCR 仪为 BioRad S1000 (Bio-Rad Laboratory 公司)。PCR 反应体系：2×Premix Taq 25 μL ，上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ，DNA 模板 20 ng，ddH₂O 补足至 50 μL 。PCR 扩增条件：94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 30 s，52 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，共 30 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。每个样本进行 3 个重复，并将同一样本的 PCR 产物进行混合。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的片段长度和浓度，主带长度在正常范围内才可用于进一步的实验。

表 1 地下水站点基本信息

Table 1 Basic information of groundwater stations

Serial number	Sample ID	East longitude	Latitude of north	Type of groundwater	Wellhead surface elevation (m)	Depth of well (m)
1	JF	114.983 0°	27.117 0°	Pore water	74.446	14.80
2	TY	115.046 4°	27.131 5°	Pore water	55.295	9.00
3	QNXX	114.962 5°	27.200 6°	Pore water	59.409	7.95
4	ZX	115.113 4°	26.975 2°	Pore water	55.697	14.45
5	YX	114.246 0°	26.956 9°	Pore water	112.587	13.70
6	SC	114.514 0°	26.324 0°	Pore water	105.131	6.99
7	YF	115.085 0°	27.331 0°	Pore water	70.860	13.70
8	CP	114.230 7°	26.497 0°	Split water	568.754	100.00
9	TH	114.886 4°	26.796 9°	Pore water	60.841	20.80
10	XX	114.551 0°	26.453 0°	Pore water	61.019	12.50
11	BQ	115.150 0°	27.550 0°	Pore water	42.298	13.58

1.5 基因文库的构建与序列分析

使用 ALFA-SEQ DNA Library Prep Kit 试剂盒[方舟生物安全科技(广州)有限公司]进行文库建库, 采用 Qubit 4.0 荧光仪(Life Technologies 公司)和高通量核酸蛋白分析系统(徐州厚泽生物科技有限公司)对文库质量进行检测。使用 Illumina NovaSeq 6000 平台对文库进行测序, 得到 250 bp 的双端 reads。

1.6 实时荧光定量 PCR 分析

实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)是指在 PCR 体系中加入荧光基团, 通过荧光信号不断累积而实现实时监测 PCR 全程的技术, 在实时荧光定量 PCR 中, 对 PCR 扩增过程进行全程实时检测, 根据反应时间和荧光信号的变化可以绘制成一条曲线^[21]。本研究通过普通 PCR 和 qPCR 对 *hzsB* (联氨合成酶关键基因)进行检测, 可定量菌种丰度。*hzsB* 功能基因已被多次用于生物标记基因来进行厌氧氨氧化菌的定量和生物多样性研究^[22-23]。其定量 PCR 采用 SYBR Green 法, 水样过滤后

生物信息截留至滤膜上, 经过 DNA 提取之后, 采用厌氧氨氧化菌功能基因 *hzsB* 的一对特征引物 *hzsB*_396F (5'-ARGGHTGGGGHAGYTG GAAG-3')和 *hzsB*_742R (5'-GTYCCHACRTCAT GVGTCCTG-3')进行 PCR 扩增^[12], PCR 扩增体系(30 μ L): 2 \times Taq Mix 15 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 12 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 52–65 $^{\circ}$ C 梯度退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 最后 16 $^{\circ}$ C 保持 1 min。将已知拷贝数质粒的 DNA 按照 10 倍进行梯度稀释, 得到的 6 个标准样品同时进行定量扩增, 得到标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 理化指标分析

2023 年全年按照每季度一次的频率采集地下水样品进行检测分析。地下水常规理化指标测定结果如表 2 所示。吉安市地下水 pH 值处于 (5.5 \pm 0.2)–(7.0 \pm 0.1), 基本呈酸性; 电导率介于

表 2 吉安市地下水理化指标测试结果

Table 2 Test results of physical and chemical indexes of groundwater in Ji'an City

Items	JF	TY	QNXX	ZX	YX	SC	YF	CP	TH	XX	BQ
pH	5.5	6.3	6.9	6.7	6.8	5.8	6.2	6.8	7.0	5.9	6.3
EC (μ S/cm)	370	539	518	772	524	221	196	315	753	273	228
COD _{Mn} (mg/L)	1.0	0.6	0.8	1.1	0.9	ND	0.8	ND	ND	ND	ND
NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	0.245	0.088	ND	5.173	ND	ND	ND	ND	0.031	ND	ND
NO ₂ ⁻ -N (mg/L)	ND	ND	ND	ND	0.143	ND	ND	ND	0.123	ND	ND
NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	12.584	11.924	3.758	0.203	7.154	7.473	1.525	1.060	6.499	5.633	5.740
Zn (mg/L)	0.025 8	0.008 9	0.000 7	0.004 1	0.002 1	0.005 5	0.006 2	0.000 9	0.024 1	0.124 4	0.013 1
Fe (mg/L)	0.016	0.012	0.019	0.015	0.008	0.035	0.043	0.007	0.014	0.025	0.001
Mn (mg/L)	0.179	0.150	0.104	1.423	0.065	0.040	0.246	0.008	0.133	0.019	0.033
Al (mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F ⁻ (mg/L)	0.11	0.17	0.25	0.13	0.18	0.05	0.07	0.13	0.24	0.07	0.12
Cl ⁻ (mg/L)	25.08	67.49	19.87	54.90	24.26	21.78	15.50	2.06	17.62	26.11	9.17
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	45.81	11.87	29.60	37.34	44.19	5.24	7.08	9.66	27.39	19.51	9.10

ND: Not detected.

(196±36)–(772±50) $\mu\text{S}/\text{cm}$ ，由此可知地下水中离子含量处于较高水平；由于地下水本身的特点，水中含有机质较少，这与表2中高锰酸盐指数均处于较低水平情况相符合；根据《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2022)^[24]，样品中铁、锌、铝金属离子指标含量较低符合标准，但11个地下水站点有6个站点的锰含量超过限值，尤其是ZX站点超标了13.3倍；氟化物、氯化物、硫酸盐含量均在标准限值内；11个地下水研究点，氨氮及硝酸盐氮含量超标点位有3个，超标率达27.3%。根据GB 5749—2022^[24]，11个地下水站点仅有2个站点的水质符合要求，超标率达81.8%。若农村居民直接饮用不达标的地下水可能会造成一定的健康隐患。

2.2 吉安市地下水氮分布

各研究点的“三氮”形态浓度百分比如图1所示，地下水中硝态氮为氮的主要赋存形态，除ZX站点之外，其他站点硝酸盐氮形态占比达95%以上。与其他站点相比，ZX站点位于水田旁边，其高浓度氨氮的出现可能是农田施用的粪肥和铵肥的残留，以及地表水灌溉的补给造成的。“三氮”总量如图2所示，“三氮”总量最高的站点为JF，其次为TY，年平均“三氮”总量为12.0 mg/L左右，“三氮”总量最低站点为CP，含量为1.0 mg/L左右。对采样位置进行分析，JF和TY站点位于吉安市城镇区域，人员密集；而CP站点位于受人类活动影响较少的丘陵山区，并且海拔较高。

综上所述，吉安市地下水中氮的分布特征说明土地利用类型、人类活动、地质地貌、农业活动(肥料施用和灌溉等)等均会影响地下水中氮的组成和浓度。

2.3 微生物群落结构和物种组成

通过对吉安市地下水进行微生物高通量测序分析，根据97%的一致性对有效序列进行操作

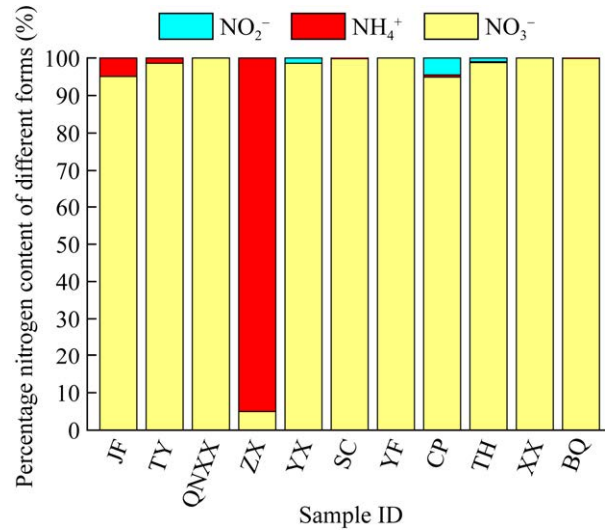


图1 各研究点“三氮”含量百分比

Figure 1 The “three nitrogen” content percentage of each research site.

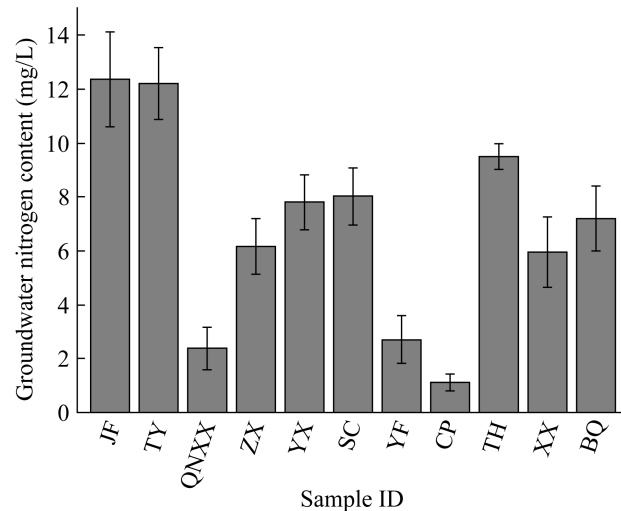


图2 各研究点“三氮”总量

Figure 2 The “three nitrogen” content of each site.

分类单元(operational taxonomic unit, OTU)划分，最后对代表序列进行聚类分析。群落多样性结果如表3所示。高通量测序得到的优化序列数为65 220–85 905，最大值为TH站点(85 905)，最小值为SC站点(65 220)；经OTU分类后以97%相似度划分得到单个样品的OTU数量为1 000–3 421，

表 3 吉安市地下水高通量测序数据、 α 多样性指数

Table 3 High-throughput sequencing data and alpha diversity index of groundwater in Ji'an City

Sample ID	Sequence number	OTU number	Shannon index	Chaol index	Coverage	Simpson index
JF	72 916	2 430	6.17	2 430.5	0.990 9	0.101
TY	71 936	2 163	5.40	2 163.5	0.991 5	0.120
QNXX	77 195	3 421	6.71	3 421.3	0.990 0	0.060
ZX	74 113	2 785	6.40	2 785.4	0.990 7	0.069
YX	82 736	1 278	5.41	1 279.1	0.995 2	0.052
SC	65 220	1 581	4.95	1 581.9	0.992 3	0.133
YF	78 409	2 121	6.16	2 121.8	0.992 7	0.058
CP	76 398	2 418	5.17	2 418.4	0.993 3	0.202
TH	85 905	1 000	4.11	1 001.1	0.996 2	0.146
XX	77 997	1 766	5.92	1 766.6	0.994 5	0.072
BQ	76 729	2 769	7.26	2 769.5	0.992 8	0.034

最大值为 QNXX 站点(3 421), 最小值为 TH 站点(1 000); Shannon 指数为 4.11–7.26, 最大值为 BQ (7.26), 最小值为 TH 站点(4.11); 地下水样品文库的覆盖率(coverage)范围均在 99.00%以上, 说明地下水样本中基因序列检出概率很高, 数据具有较好的可靠性。Simpson 指数和 Shannon 指数均说明 BQ 站点地下水微生物群落多样性最高。

通过高通量测序平台分析比对后, 物种组成结构如表 4 所示。不同的地下水样品的微生物在门、纲、目、科、属等级中存在一定的差

表 4 吉安市地下水物种组成结构

Table 4 Species composition and structure of groundwater in Ji'an city

Sample ID	Phylum	Class	Order	Family	Genus
JF	51	104	193	239	364
TY	48	93	176	210	301
QNXX	56	110	215	254	325
ZX	60	104	203	218	311
YX	49	87	173	190	260
SC	45	86	166	214	304
YF	56	108	199	225	310
CP	52	100	195	237	358
TH	44	78	123	162	202
XX	50	100	174	204	253
BQ	53	110	208	227	317

异性。门的数量为 44–60; 纲的数量为 78–110; 目的数量为 123–208; 科的数量为 162–254; 属的数量为 202–358。从表 4 中可以得出 TH 站点在门、纲、目、科、属等级微生物种类是最少的。

图 3 为各地下水站点门水平上的细菌分类, 将菌群丰度小于 1%的合并为 others 组。11 个样品平均相对丰度最高的是变形菌门 (*Proteobacteria*, 64.95%), 而后依次是拟杆菌门 (*Bacteroidetes*, 9.71%)和放线菌门 (*Actinobacteria*, 4.08%)。根据 16S rRNA 基因同源性, 厌氧氨氧化菌隶属于浮霉菌门 (*Planctomycetes*), 从图 3 中可以看出, 浮霉菌门在地下水中所占的比例较小, 可知厌氧氨氧化菌在红壤地下水生境中仅是众多微生物的一小部分。厌氧氨氧化体膜上致密的阶梯烷脂膜结构决定了厌氧氨氧化菌具有极强生命力^[25], 厌氧氨氧化菌虽然在红壤地下水生境中丰度较低, 但它对生态系统氮循环的贡献不容忽视。

2.4 厌氧氨氧化细菌 *hzsB* 基因的丰度

对 11 个地下水样品进行实时荧光定量 PCR 分析, 得到厌氧氨氧化细菌 *hzsB* 基因拷贝数, 结果如图 4 所示。由图 4 可知, ZX 和 YF 两个站点的厌氧氨氧化菌的 *hzsB* 基因拷贝数在

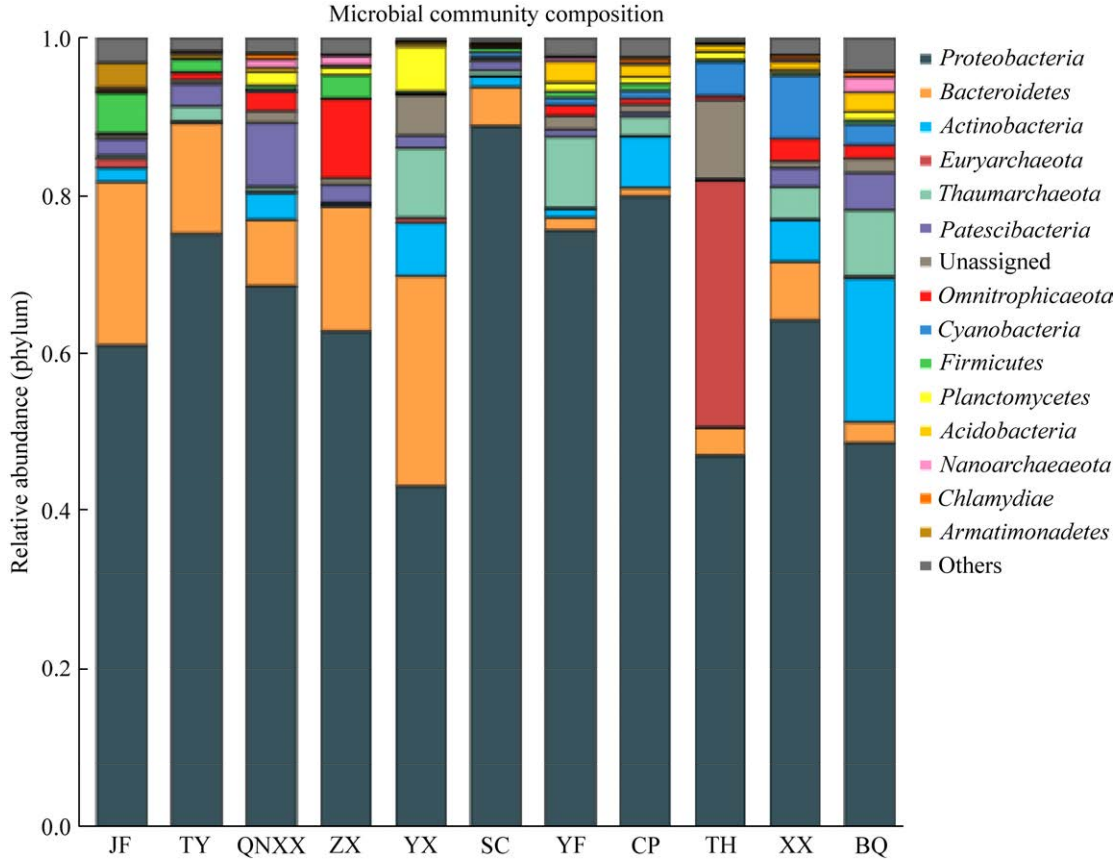


图3 各研究点细菌门水平分类图

Figure 3 Map of phylum level classification of bacteria at each study site.

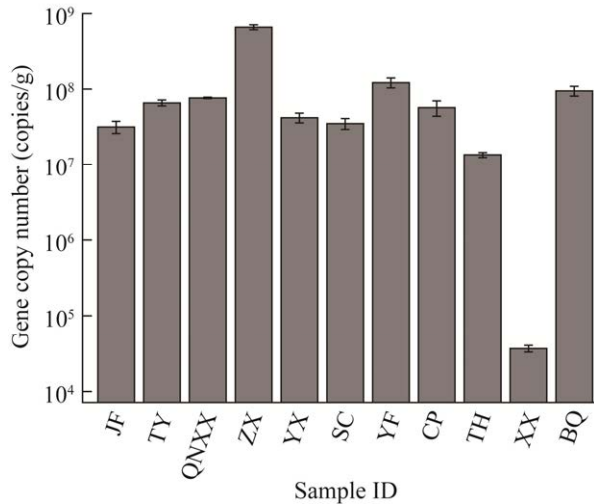


图4 各研究点厌氧氨氧化细菌定量分析结果

Figure 4 Results of quantitative analysis for the anammox bacteria at each study site.

10^8 copies/g 的水平, ZX 站点的 *hzsB* 基因拷贝数最大, 为 6.62×10^8 copies/g, 其次为 YF 站点, 其 *hzsB* 基因拷贝数 1.22×10^8 copies/g; JF、TY、QNXX、YX、SC、CP、TH、BQ 站点的厌氧氨氧化细菌 *hzsB* 基因拷贝数处于 10^7 copies/g 的水平, 范围在 $1.34 \times 10^7 - 9.50 \times 10^7$ copies/g; XX 站点的厌氧氨氧化细菌 *hzsB* 基因拷贝数最低, 仅为 3.67×10^4 copies/g。与湿地^[13]、土壤^[26]地表水沉积物^[27]等生态系统相比, 红壤地下水厌氧氨氧化菌功能基因拷贝数更高, 说明地下水有机质含量少、氧含量低及系统更新周期长等环境特性更适合厌氧氨氧化细菌生长代谢。

2.5 厌氧氨氧化细菌的群落组成

基于高通量测序分析结果, 经 Ribosomal

Database Project 数据库(RDP, <https://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)进行比对后, 在 11 个红壤地下水样品中均成功检测到了厌氧氨氧化菌属: *Candidatus Brocadia*、*Candidatus Scalindua*、*Candidatus Jettenia*、*Candidatus Kuenenia*, 这与前人研究在淡水、湿地和湖泊底泥等生境中厌氧氨氧化菌属群落结构相似^[13,28-29]。统计隶属于每个种属中的 OTU 的序列条数, 统计各样点中厌氧氨氧化细菌中各属的相对丰度, 计算结果如图 5 所示。11 个地下水研究点中平均 *Candidatus Brocadia* 丰度值为 62.47%, 平均 *Candidatus Scalindua* 丰度值为 17.44%, 平均 *Candidatus Jettenia* 丰度值为 14.41%, 平均 *Candidatus Kuenenia* 丰度值为 5.67%。由图 5 可知, 不同研究点的厌氧氨氧化菌属分布存在一定的差异性。除 YX 研究点外, *Candidatus Brocadia* 占据绝对优势, 并且比例较大(>50.00%), 尤其是 CP 和 XX 两个研究点 *Candidatus Brocadia* 占比超过 80.00% (分别为 84.58%和 89.88%); *Candidatus Scalindua* 丰度分布差异较大, YX 点 *Candidatus Scalindua* 相对丰度高达 56.44%, TY 点 *Candidatus Scalindua* 相对丰度仅占 5.89%; *Candidatus Jettenia* 占比最高点为 YF 站点, 值为 21.71%, 占比最低点为 XX 站点, 值为 0.77%; *Candidatus Kuenenia* 占比最高点为 SC 站点, 值为 16.33%, 占比最低点为 XX 站点, 值为 0.81%。结果表明厌氧氨氧化菌的空间异质性。

2.6 厌氧氨氧化菌分布及其环境因子分析

为了探究厌氧氨氧化菌群落结构是否受到关键环境因子的影响, 用 11 个研究点厌氧氨氧化菌基因丰度和 4 个厌氧氨氧化菌属的相对丰度分别与地下水的理化指标进行皮尔逊相关性分析和冗余分析, 结果分别如表 5 和图 6 所示。皮尔逊分析结果表明, 氨氮($r=0.908$, $P<0.01$)和锰($r=0.982$, $P<0.01$)与厌氧氨氧化菌基因丰

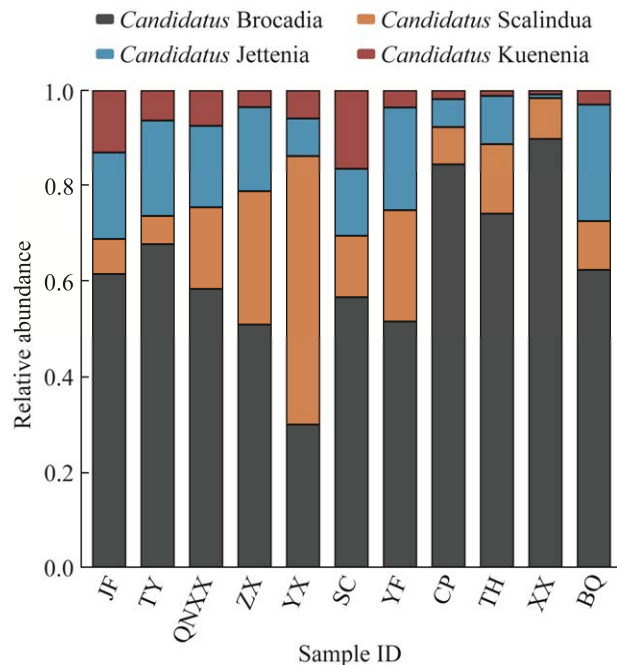


图 5 各研究点厌氧氨氧化细菌相对丰度图

Figure 5 Relative abundance of anammox bacteria at each site.

度相关性为倾向性显著; 氯化物($r=0.666$, $P<0.05$)与厌氧氨氧化菌基因丰度相关性为显著, 由此表明地下水中氨氮、锰^[30]、氯化物的含量可能会增强厌氧氨氧化菌的活性。锌($r=-0.080$, $P=0.815$)和硝酸盐($r=-0.256$, $P=0.447$)与厌氧氨氧化菌基因丰度呈负相关; pH 值、总氮、高指、氟化物、硫酸盐的相关系数较小, 说明厌氧氨氧化菌的含量受地下水中 pH 值、总氮、高指、氟化物、硫酸盐含量影响不明显。

冗余分析结果表明, 不同的厌氧氨氧化菌属对环境因子的相关性有较大差异(图 6)。*Candidatus Brocadia* 与所有的环境因子都呈负相关性。*Candidatus Scalindua* 与氟化物、氨氮、硫酸盐、锰、氯化物、pH 值、总氮为正相关, 相关性依序下降。*Candidatus Jettenia* 和 *Candidatus Kuenenia* 丰度值与硝酸盐、锌、高锰酸盐指数、总氮等表现为显著正相关。

表 5 厌氧氨氧化菌基因丰度与环境因子的相关性分析($n=11$)Table 5 Correlation analysis between abundance of anammox bacteria and environmental factors ($n=11$)

Parameter	pH	NH ₄ ⁺ -N	TN	COD _{Mn}	Mn	Zn	F ⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻ -N	SO ₄ ²⁻
r	0.049	0.908**	0.092	0.408	0.982**	-0.080	0.324	0.666*	-0.256	0.182
P	0.887	0.000	0.789	0.213	0.000	0.815	0.331	0.025	0.447	0.592

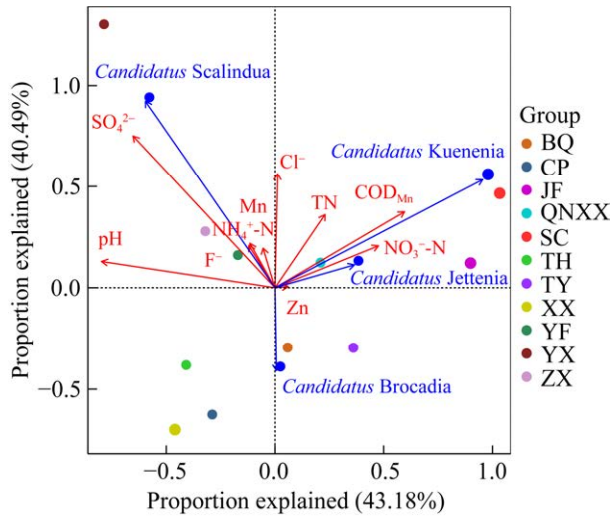
*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

图 6 厌氧氨氧化细菌各属与环境因子的冗余分析图

Figure 6 RDA between anammox bacteria genera and environmental factors.

3 结论

(1) 对 11 个地下水研究点的常规理化指标进行测定, 仅有 2 个站点的水质符合《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2022)要求。在不同点位各形态氮含量有较大差异, 与其他站点相比, ZX 位于水田旁边, 其高浓度氨氮的出现可能是农田施用的粪肥和铵肥的残留, 以及地表水灌溉的补给造成的。通过对各研究点“三氮”总量进行对比分析, 结果表明人员密集平原城区“三氮”总量高, 人烟稀少的山区“三氮”总量低。地下水中氮的分布特征说明土地利用类型、人类活动、地质地貌、农业活动(肥料施用和灌溉等)等会影响地下水中氮的组成和浓度。

(2) 厌氧氨氧化菌 *hzsB* 基因丰度测试结果

表明: 地下水中厌氧氨氧化菌广泛存在, 但不同点位基因丰度存在较大差异, 11 个样品的厌氧氨氧化细菌 *hzsB* 基因拷贝数在 3.67×10^4 – 6.62×10^8 copies/g。与其他生态系统相比, 红壤地下水厌氧氨氧化菌功能基因拷贝数更高, 说明地下水有机质含量少、氧含量低、系统更新周期长等环境特性更适合厌氧氨氧化细菌生长代谢。

(3) 11 个研究点均检测出 4 个厌氧氨氧化菌属, 分别为 *Candidatus Brocadia*、*Candidatus Jettenia*、*Candidatus Kuenenia* 和 *Candidatus Scalindua*。地下水研究点中 *Candidatus Brocadia* 为优势菌属, 平均丰度值为 62.47%, *Candidatus Scalindua* 平均丰度值为 17.44%, *Candidatus Jettenia* 平均丰度值为 14.41%, *Candidatus Kuenenia* 平均丰度值为 5.67%。相对丰度结果显示, 各研究点的主导菌属有所差异。

(4) 相关性分析结果表明, 氨氮、锰、氯化物与厌氧氨氧化菌基因丰度相关性显著, 即地下水中氨氮、锰、氯化物的含量可能会增强厌氧氨氧化菌的活性及丰度; 锌、硝酸盐与厌氧氨氧化菌基因丰度呈负相关; 厌氧氨氧化菌的含量与地下水中 pH 值、总氮、高指、氟化物、硫酸盐含量相关性不明显; *Candidatus Brocadia* 与所有的环境因子都呈负相关性。*Candidatus Scalindua* 与氟化物、氨氮、硫酸盐、锰、氯化物、pH 值、总氮为正相关, 相关性依序下降。*Candidatus Jettenia* 和 *Candidatus Kuenenia* 丰度值与硝酸盐、锌、高锰酸盐指数、总氮等表现为显著正相关。

参考文献

- [1] 洪义国, 李益本, 吴佳鹏, 陈光仕, 黄天政, 陈帅. 高通量测序分析多种典型生境中厌氧氨氧化细菌的多样性分布特征[J]. 微生物学通报, 2019, 46(11): 2865-2876.
HONG YG, LI YB, WU JP, CHEN GS, HUANG TZ, CHEN S. Diversity analysis of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in typical habitats by high throughput sequencing[J]. Microbiology China, 2019, 46(11): 2865-2876 (in Chinese).
- [2] 罗泽娇, 靳孟贵. 地下水三氮污染的研究进展[J]. 水文地质工程地质, 2002, 29(4): 65-69.
LUO ZJ, JIN MG. Research progress of ammonia, nitrite and nitrate pollution in groundwater[J]. Hydrogeology and Engineering Geology, 2002, 29(4): 65-69 (in Chinese).
- [3] FENG AJ, XIAO X, YE CC, XU XM, ZHU Q, YUAN JP, HONG YH, WANG JH. Isolation and characterization of *Burkholderia fungorum* Gan-35 with the outstanding ammonia nitrogen-degrading ability from the tailings of rare-earth-element mines in southern Jiangxi, China[J]. AMB Express, 2017, 7(1): 140.
- [4] BUSS SR, HERBERT AW, MORGAN P, THORNTON SF, SMITH JWN. A review of ammonium attenuation in soil and groundwater[J]. Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology, 2004, 37(4): 347-359.
- [5] 王鹏, 吴莹, 刘素美, 王晓娜, 戴金龙, 叶祁. 长江口外低氧区及其邻近海域表层沉积物反硝化微生物多样性和分布特征[J]. 微生物学报, 2021, 61(6): 1474-1487.
WANG P, WU Y, LIU SM, WANG XN, DAI JL, YE Q. Diversity and distribution of denitrifying microorganisms in the surface sediments of the hypoxic zone near the Changjiang Estuary and its offshore[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(6): 1474-1487 (in Chinese).
- [6] ZHANG YT, WU JH, XU B. Human health risk assessment of groundwater nitrogen pollution in Jinghui canal irrigation area of the loess region, Northwest China[J]. Environmental Earth Sciences, 2018, 77(7): 273.
- [7] MOORE TA, XING YP, LAZENBY B, LYNCH MDJ, SCHIFF S, ROBERTSON WD, TIMLIN R, LANZA S, RYAN MC, ARAVENA R, FORTIN D, CLARK ID, NEUFELD JD. Prevalence of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in contaminated groundwater[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(17): 7217-7225.
- [8] 全晓霞, 王广才, 许庆宇, 邢红莲, 蒋万军, 历浩然. 豫北平原地下水中厌氧氨氧化菌的分布特征及对氮循环的影响[C]//中国环境科学学会 2016 年学术年会, 2016.
TONG XX, WANG GC, XU QY, XING HL, JIANG WJ, LI HR. Distribution characteristics of anammox in groundwater and its effect on nitrogen cycle in Henan Northern Plain[C]//2016 Academic annual meeting of Chinese Society of Environmental Sciences, 2019 (in Chinese).
- [9] KUENEN JG. Anammox bacteria: from discovery to application[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6: 320-326.
- [10] 苏雷, 向韬, 李倩倩, 马哲. 厌氧氨氧化菌驱动脱氮途径的研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1379-1391.
SU L, XIANG T, LI QQ, MA Z. Pathways of denitrification driven by anaerobic ammonia-oxidizing bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1379-1391 (in Chinese).
- [11] FU BB, LIU JW, YANG HM, HSU TC, HE BY, DAI MH, KAO SJ, ZHAO MX, ZHANG XH. Shift of anammox bacterial community structure along the Pearl Estuary and the impact of environmental factors[J]. Journal of Geophysical Research: Oceans, 2015, 120(4): 2869-2883.
- [12] QIN H, HAN C, JIN Z, WU L, DENG H, ZHU G, ZHONG W. Vertical distribution and community composition of anammox bacteria in sediments of a eutrophic shallow lake[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 125(1): 121-132.
- [13] 徐栎亚, 赵雪, 庄林杰, 李怡潇, 刘莉莉, 祝贵兵. 基于 *hzsB* 功能基因研究典型湿地沉积物中厌氧氨氧化细菌的群落结构[J]. 环境科学学报, 2017, 37(12): 4636-4645.
XU LY, ZHAO X, ZHUANG LJ, LI YX, LIU LL, ZHU GB. Community structure analysis of anaerobic ammonium oxidation bacteria in wetland sediments based on hydrazine synthase β -subunit[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2017, 37(12): 4636-4645 (in Chinese).
- [14] HONG YG, LI M, CAO HL, GU JD. Residence of habitat-specific anammox bacteria in the deep-sea subsurface sediments of the South China Sea: analyses of marker gene abundance with physical chemical parameters[J]. Microbial Ecology, 2011, 62(1): 36-47.
- [15] 赵其国, 黄国勤, 马艳芹. 中国南方红壤生态系统面临的问题及对策[J]. 生态学报, 2013, 33(24): 7615-7622.
ZHAO QG, HUANG GQ, MA YQ. The problems in red

- soil ecosystem in southern of China and its countermeasures[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(24): 7615-7622 (in Chinese).
- [16] 江西省地质矿产局. 江西省区域地质志[M]. 北京: 地质出版社, 1984: 263.
Jiangxi Provincial Bureau of Geology and Mineral Resources. Regional Geology of Jiangxi Province[M]. Beijing: Geological Publishing House, 1984: 263 (in Chinese).
- [17] 刘细元. 江西省吉安市地下水系统防污性能评价[J]. 地质调查与研究, 2006, 29(3): 217-221.
LIU XY. Appraisal of autipollution capability of groundwater systems in Ji'an City, Jiangxi Province[J]. Geological Survey and Research, 2006, 29(3): 217-221 (in Chinese).
- [18] 沈帅. 河岸渗滤过程对地下水中氨氮的调控机制[D]. 武汉: 中国地质大学博士学位论文, 2021.
SHEN S. Regulatory mechanisms of riverbank filtration (RBF) on ammonium in groundwater[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of China University of Geosciences, 2021 (in Chinese).
- [19] 刘超, 张旭虎, 李辉, 蒲丛林, 朱小龙. 廊坊市地下水质量现状评价与分析[J]. 环境化学, 2018, 37(6): 1399-1409.
LIU C, ZHANG XH, LI H, PU CL, ZHU XL. Groundwater quality assessment and analysis in Langfang City[J]. Environmental Chemistry, 2018, 37(6): 1399-1409 (in Chinese).
- [20] 龙超, 刘仁绿, 尹丽, 宋勇生, 贺根和, 刘祖文. 酸性红壤有机碳组成与微生物种群特征的相关性研究[J]. 环境科学学报, 2024, 44(1): 377-388.
LONG C, LIU RL, YIN L, SONG YS, HE GH, LIU ZW. Correlation between organic carbon composition and microbial population characteristics in acidic red soil[J]. Journal of Environmental Sciences, 2024, 44(1): 377-388 (in Chinese).
- [21] DAI WJ, LIU RL, YANG F, HE GH, WEI CY. Denitrifying bacteria agent together with composite materials enhanced soil chemical properties and denitrifying functions in rare earth tailings: a field study[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 448: 130913.
- [22] LIU LJ, JI M, WANG F, YAN Z, TIAN ZK. Response of nitrogen removal performance, functional genes abundances and N-acyl-homoserine lactones release to carminic acid of anammox biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 299: 122567.
- [23] ZHANG MP, DAI PL, LIN XL, LIN LA, HETHARUA B, ZHANG YM, TIAN Y. Nitrogen loss by anaerobic ammonium oxidation in a mangrove wetland of the Zhangjiang Estuary, China[J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 698: 134291.
- [24] 中华人民共和国国家标准. 生活饮用水卫生标准: GB 5749—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
National standards of the People's Republic of China. Hygienic standard for drinking water: GB 5749—2022[S]. Beijing: China Standards Press, 2022 (in Chinese).
- [25] 祝贵兵. 陆地和淡水生态系统新型微生物氮循环研究进展[J]. 微生物学报, 2020, 60(9): 1972-1984.
ZHU GB. Novel nitrogen cycles in terrestrial and freshwater ecosystems[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(9): 1972-1984 (in Chinese).
- [26] 孙梅, 聂三安, 龙泽东, 李超, 王华, 肖小平, 罗尊长, 孙耿. 水稻土厌氧氨氧化对不同耕作方式与秸秆还田的响应[J]. 土壤学报, 2022, 59(6): 1695-1703.
SUN M, NIE SA, LONG ZD, LI C, WANG H, XIAO XP, LUO ZC, SUN G. Response of paddy soil anammox bacteria to rice straw returning and different tillage practices[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2022, 59(6): 1695-1703 (in Chinese).
- [27] 李佳霖, 秦松. 弥河沉积物的反硝化和厌氧氨氧化过程[J]. 中国环境科学, 2021, 41(4): 1588-1596.
LI JL, QIN S. Denitrification and anammox processes in sediment of Mihe River, China[J]. *China Environmental Science*, 2021, 41(4): 1588-1596 (in Chinese).
- [28] 沈李东, 胡宝兰, 郑平, 钱轶超, 陈婷婷, 胡安辉, 楼莉萍. 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, 2011, 31(8): 1609-1615.
SHEN LD, HU BL, ZHENG P, QIAN YC, CHEN TT, HU AH, LOU LP. Molecular detection of anammox bacteria in the sediment of West Lake, Hangzhou[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(8): 1609-1615 (in Chinese).
- [29] 洪义国, 黄天政, 李益本, 吴佳鹏, 焦黎静, 崔明超. 基于数据库分析不同类型生境中厌氧氨氧化细菌的多样性分布特征[J]. 微生物学报, 2019, 59(6): 1143-1155.
HONG YG, HUANG TZ, LI YB, WU JP, JIAO LJ, CUI MC. Community structure and distribution of anammox bacteria in different habitat[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(6): 1143-1155 (in Chinese).
- [30] HUANG XL, GAO DW, PENG S, TAO Y. Effects of ferrous and manganese ions on anammox process in sequencing batch biofilm reactors[J]. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 2014, 26(5): 1034-1039.