

doi: 10.7541/2019.134

城市景观水体中固氮微生物多样性及固氮活性检测

卢韩杨 潘文静 马晓洁 李勤 刘洋

(河南师范大学生命科学院, 新乡 453007)

摘要: 为探究城市景观水体中固氮微生物群落结构、多样性及固氮活性, 揭示水体中固氮蓝藻的固氮贡献, 研究选取新乡市牧野湖和人民公园水体两个小型水体进行研究。通过理化指标测定, 发现两个水体均处于富营养化状态, 借助高通量测序, 对两水体中微生物的16S rDNA和固氮酶*nifH*基因进行测序, 并利用乙炔还原法测定水体中固氮微生物的固氮速率。结果表明: 牧野湖水体中的原核生物类群共检测出32个门, 275个属; 固氮微生物共检测出9个门, 66个属。人民公园水体中的原核生物类群共检测出31个门, 238个属; 固氮微生物共检测出4个门, 13个属。固氮蓝藻在两个水体固氮微生物类群中分别占有3%和9.3%, 牧野湖固氮微生物丰富度相对较高, 与人民公园水体固氮微生物多样性差异较大。乙炔还原法测固氮速率结果显示, 两水体均未检测到固氮活性, 推测在富营养化的水体中固氮活性可能被抑制。

关键词: 景观水体; 固氮微生物; 蓝藻; 高通量测序; 乙炔还原法

中图分类号: Q178.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2019)05-1139-08

随着中国城镇化进程的加速, 城市基础设施建设不断完善, 城市景观水体不仅兼顾了蓄水防洪等生态功能, 更是市民休闲娱乐的场所。人为影响导致了其水质变化较大, 富营养状况不容乐观。牧野湖是位于河南省新乡市的一个人工湖, (N35°18'13.71", E113°55'15.05"), 与贯穿新乡市区的卫河相连, 总面积约 $2.23 \times 10^5 \text{ m}^2$, 平均水深约1.5 m; 人民公园水域相对独立, 面积约 $1.9 \times 10^4 \text{ m}^2$ 。两水体水流较为缓慢, 水体的水质较差, 已有研究对牧野湖的浮游植物分布^[1]进行了报道, 长期的监测发现两水体在夏季均会出现蓝藻水华, 主要以单细胞和丝状蓝藻为主^[2]。

生物固氮是地球氮素循环中重要的环节, 目前已知的固氮生物主要限于原核生物, 而固氮蓝藻便是其中一个类群^[3, 4]。富营养水体中的固氮类群种类多样, 且不同水体具有地域差异, 虽然固氮过程对于固氮微生物而言是一个主动耗能的过程^[5], 但在富营养水体仍具有微弱的固氮效率^[6], 在这其中固氮微生物与固氮蓝藻的贡献如何, 目前报道较少, 本研究选取了两个城市小型景观水体, 借助高通量

测序手段来研究其内部固氮微生物类群组成及多样性情况, 并对水体进行了原位固氮率的检测, 来综合评估固氮微生物的固氮作用及固氮蓝藻可能的贡献。

1 材料与方法

1.1 水样采集和理化指标测定

在新乡市牧野湖和人民公园水体各设置3个采样点(图1), 采样时间为2016年8月, 用2 L采水器对水体采样, 将水样带回实验室进行微孔滤膜(Millipore, 0.2 μm)过滤, 过滤200 mL用于DNA提取。水体的理化指标: 总氮(TN)、总磷(TP)、氨氮(NH_4^+-N)、化学需氧量(COD), 使用紫外可见多参数水质测定仪(连华科技, 北京)进行测定, 水温、pH和透明度均为现场测定。

1.2 16S rDNA和*nifH*基因高通量测序

滤膜总DNA的提取采用CTAB法^[7], 提取的DNA保存于 -20°C , 用于PCR及高通量测序实验。为确定两个水体中原核生物群落的多样性, 采用16S通用引物341F(5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-

收稿日期: 2018-09-11; 修订日期: 2019-02-20

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(19A180018); 国家自然科学基金(31400395)资助 [Supported by the Henan Provincial Higher Education Key Scientific Research Project (19A180018); the National Natural Science Foundation of China (31400395)]

作者简介: 卢韩杨(1992—), 男, 河南商丘人; 硕士研究生; 主要研究方向为藻类生理生态。E-mail: LHYang8168@163.com

通信作者: 刘洋, E-mail: ly@htu.cn

3')和806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3')^[8], 固氮微生物多样性检测选用通用引物nifH1 (5'-TGYGAYCCNAARGCNGA-3'), nifH2 (5'-ADNGCCATCATYTCCNCC-3')^[9], 借助Illumina HiSeq测序平台, 测序量不低于总量(50000)的98%, 得到的具有某些干扰数据的原始数据, 对原始数据进行一定的过滤, 就可以整理出有效数据, 这样结果更准确无误。将相似度>97%的有效序列, 可以划分为一类, 作为1个分类操作单元(Operational Taxonomic Units, OTU)。根据OTU对物种的种类进行说明, 得到物种种名信息, 对物种进行分类。从不同层次(门、纲、目、科、属、种)对物种进行多样性及所占比例进行计算^[10, 11]。运用Origin9.1软件进行作图, 不同水平层次的物种的相对丰度柱状图。采用Qiime17.0进行Shannon指数、Chao1指数、ACE指数、Coverage指数的计算, 根据指数值的大小可以反映出采样点的水体群落内生物多样性。

1.3 水体固氮作用检测

本实验采用乙炔还原法对水体微生物固氮作用进行检测^[12]。将一定量的样品放入300 mL培养瓶中, 使气液比为1:5, 塞上胶塞, 抽出2 mL空气后, 立即注入相同体积的纯乙炔气体, 放入培养室, 模

拟当地温度和光照, 培养2h后, 用微量注射器抽取100 μ L进样检测。通过气相色谱仪确定标准曲线, 并以实验室培养的固氮蓝藻鱼腥藻PCC 7120作为对照。使用气相色谱仪为Thermo TRACE 1300, 填充柱(GDX-502, 中科凯迪化工), 检测器为FID检测器, 对样品进行检测分析。

2 结果

2.1 水体理化指标

水体中氮磷含量是表征水体富营养化的重要指标, 从表1可以看出牧野湖和人民公园的总氮、总磷含量均处于水体富营养化状态(总氮含量0.3 mg/L、总磷含量0.05 mg/L)^[13], 牧野湖和人民公园水体温度相差不大, 水体pH均呈碱性。人民公园水体化学需氧量明显比牧野湖的高, 其水体透明度则相对较低, 表明人民公园水体受有机物质的污染更严重, 这可能与牧野湖水体具有流动性, 而人民公园水体相对封闭有关。牧野湖和人民公园所表现出严重的富营养化状态以及碱性的水环境可能是水华暴发的主要因素^[14]。

2.2 测序结果分析

16S rDNA高通量测序结果 通过高通量测

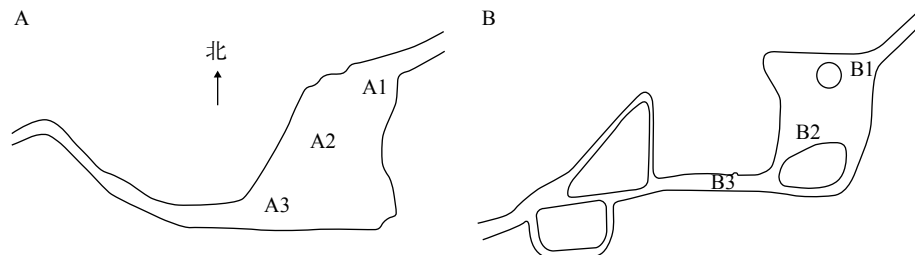


图1 牧野湖和人民公园采样点分布

Fig. 1 Sampling sites of Muye Lake and People's Park

A. 牧野湖; B. 人民公园

A. Muye Lake; B. People's Park

表1 各采样点理化指标结果

Tab. 1 Physical and chemical index of each sampling site

理化指标 Physical and chemical indicators	牧野湖的样点Sampling sites of Muye Lake				人民公园的样点Sampling sites of People's Park			
	A1	A2	A3	X \pm SD	B1	B2	B3	X \pm SD
温度Temperature ($^{\circ}$ C)	32.0	33.0	33.0	32.7 \pm 0.58 ^a	32.7	33.8	32.7	33.1 \pm 0.64 ^a
pH	10.0	10.1	10.3	10.1 \pm 0.15 ^a	10.3	11.4	10.4	10.7 \pm 0.61 ^a
透明度Transparency (cm)	52	53	55	53 \pm 1.53 ^a	35	20	20	25 \pm 8.7 ^b
化学需氧量COD (mg/L)	27.09	25.58	28.59	27.09 \pm 1.5 ^a	64.71	135.40	85.78	95.3 \pm 36.3 ^b
总氮TN (mg/L)	5.11	5.36	5.42	5.30 \pm 0.16 ^a	3.40	4.46	3.71	3.86 \pm 0.55 ^b
总磷TP (mg/L)	0.15	0.25	0.21	0.20 \pm 0.05 ^a	0.17	0.28	0.10	0.18 \pm 0.09 ^a
铵态氮NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	1.40	1.17	1.19	1.25 \pm 0.13 ^a	0.83	1.45	0.94	1.07 \pm 0.33 ^a

注: 平均数后上标不同表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different superscripts after the average indicate significant differences ($P < 0.05$)

序技术对水体细菌的16S rDNA的V3-V4可变区进行测序。为了提高后期测序信息分析的结果的准确性,对原始数据进行过滤处理之后,最终得到148507条有效序列。牧野湖和人民公园测序得到的有效序列分别是73879条(表2)、74628条。对所有样品具有97%的相似性的序列聚类成一个OTU,两个水体的有效序列共划分出1982个OTU,其中牧野湖划分出983个OTU,人民公园划分出999个OTU。牧野湖的OTU数略低于人民公园。

对两个水体从门到属依次进行分类(表2),牧野湖的细菌有32个门、60个纲、107个目、186个科、275个属。人民公园的细菌有31个门、55个纲、101个目、171个科、238个属。

nifH基因高通量测序结果 高通量测序得到180899条有效序列。牧野湖和人民公园测序得到的有效序列分别是92537条、88362条。两个水体的有效序列共划分出1408个OTU,其中牧野湖划分出1208个OTU,人民公园划分出200个OTU。牧野湖的OTU数量远远高于人民公园。对两个水体从门到属依次进行分类(表3),牧野湖的固氮微生物有9个门、15个纲、32个目、43个科、66个属。人民公园的固氮微生物有4个门、9个纲、9个目、10个科、13个属。

2.3 水体细菌群落结构

牧野湖、人民公园水体中相对丰度最高的菌群是变形菌门分别占59%和43%,牧野湖中相对丰度较高的依次有拟杆菌门和蓝藻门,分别占17%和13%;人民公园水体中相对丰度较高的依次有拟杆菌门、放线菌门和蓝藻门,分别占15%、15%和10%,在牧野湖水体中的放线菌门

所占比例仅为4%。变形菌门在2个水体中都占据了绝对优势,牧野湖蓝藻所占比例较人民公园相对高一些。其中厚壁菌门和绿弯菌门也均存在于2个水体中(图2A)。

在纲水平上对丰度前10的细菌进行分类。图2B表明:牧野湖和人民公园水体中最有优势的细菌是 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria),分别占24.9%和15.4%,其次是 β -变形菌纲(Betaproteobacteria),分别占20.3%和12.9%。其中 α -变形菌纲和 β -变形菌纲在牧野湖中所占比例相对较高。

2.4 水体固氮微生物群落结构

如图3A所示,牧野湖中固氮微生物种类相对较丰富,有变形菌门、蓝藻门和厚壁菌门等;而人民公园固氮微生物种类较少,主要有蓝藻门、变形菌门和未分类的一些微生物。其中牧野湖水样中固氮蓝藻占3%,人民公园水样中固氮蓝藻占9.3%,2个水体中固氮蓝藻所占总体比例不高。

图3B结果表明:在目水平上,牧野湖和人民公园的颤藻目分别占0.1%和0.06%,念珠藻目分别占0.09%和0.001%。牧野湖中的色球藻目占0.01%,真枝藻目占0.009%。牧野湖中固氮蓝藻物种多样性高于人民公园。

2.5 水体细菌群落和固氮微生物群落组成差异

细菌群落组成差异 通过多样性指数可以反映出样本的丰富度和均匀程度。从表4可以看出:2个水体的覆盖率指数均在99%以上,说明此次测序比较接近样本真实情况。通过Chao1、ACE、Shannon、Simpson指数可知,人民公园的细菌群落相对较丰富,细菌群落多样性相对较高,和OTU结果一致。结果表明水体细菌多样性和丰富度应该

表2 细菌16S rDNA序列分析

Tab. 2 Sequence analysis of bacterial 16S rDNA

采样点 Sampling site	序列数 Number of sequences	OTU Number of OTU	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	多样性指数 Diversity index	覆盖率 Coverage (%)
牧野湖 Muye Lake	73897	983	32	60	107	186	275	7.0	99.9
人民公园 People's Park	74628	999	31	55	101	171	238	7.7	99.8

表3 各采样点固氮微生物序列分析

Tab. 3 Sequence analysis of nitrogen-fixing microorganisms in different sampling sites

采样点 Sampling site	序列数 Number of sequences	OUTNumber of OTU	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	多样性指数 Diversity index	覆盖率 Coverage (%)
牧野湖 Muye Lake	92537	1208	9	15	32	43	66	6.78	99.9
人民公园 People's Park	88362	200	4	9	9	10	13	2.03	100

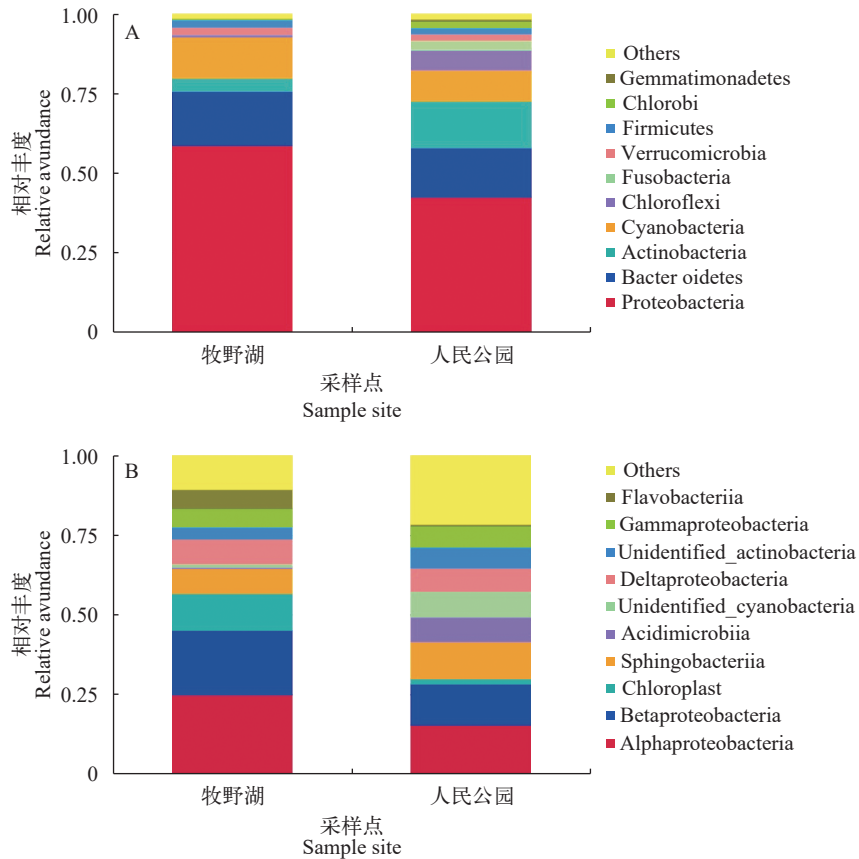


图 2 各采样点门水平(A)优势细菌分布与纲水平(B)优势细菌分布
Fig. 2 The dominant bacteria in each samling site at phylum level (A) and class level (B)

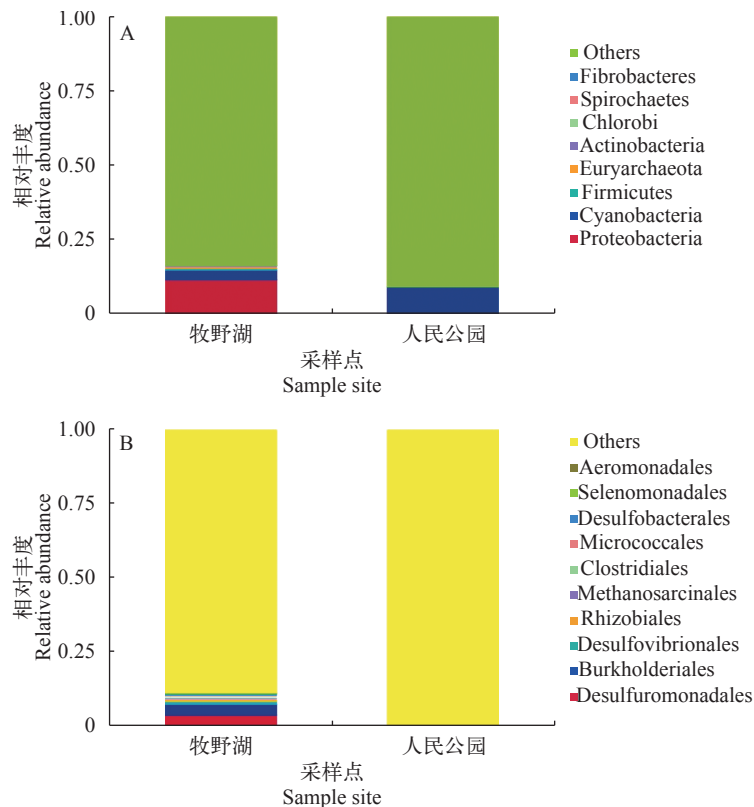


图 3 门水平(A)与目水平(B)固氮微生物丰度
Fig. 3 Richness of nitrogen-fixing microbial at phylum level and order level

表 4 细菌群落Alpha多样性指数

Tab. 4 Alpha diversity indexes of bacterial community

采样点 Sampling site	观察的种类 Observed-species	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	Chao1指数 Chao1 index	ACE指数 ACE index	样品覆盖率 Goods-coverage
牧野湖 Muye Lake	930	7.023	0.977	977.143	983.316	0.999
人民公园 People's Park	999	7.688	0.99	1103.5	1075.772	0.998

和水体水质有一定关系。

图 4A 结果表明: 人民公园的 Rank Abundance 曲线相对比牧野湖的曲线宽, 说明人民公园的物种组成较丰富, 此结果与 Chao1、ACE 指数相一致。牧野湖和人民公园的 Rank Abundance 曲线相对较平缓, 两者物种组成比较均匀, 物种分布均匀程度相差不大。

根据所有样品之间共有、特有的 OTU 进行韦恩图(Venn Graph)的绘制, 图 4B 可知: 牧野湖和人民公园共有 698 个 OTU, 牧野湖特有的 232 个 OTU, 人民公园特有 301 个 OTU。这说明 2 个水体中物种组成相似度比较高。

固氮微生物群落组成差异 从表 5 可以看

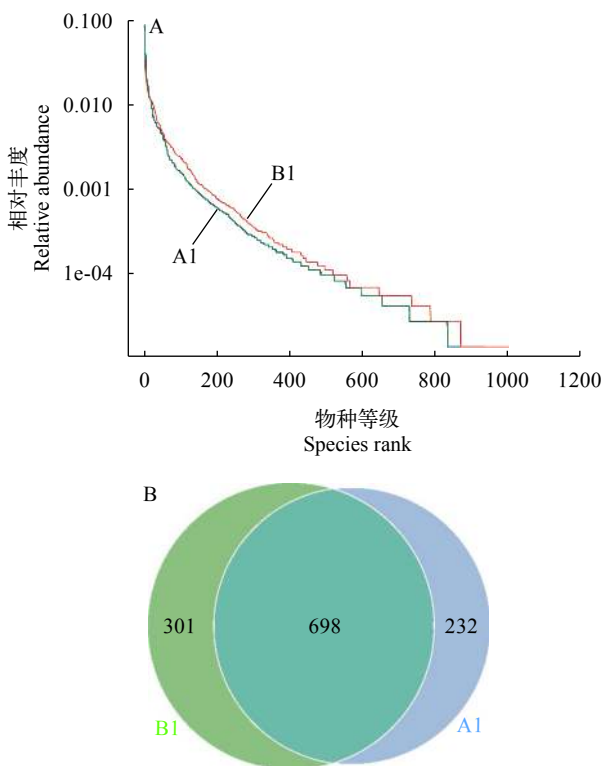


图 4 Rank Abundance 曲线(A)与基于 OTU 的 Venn 图(B)

Fig. 4 Rank Abundance Curve (A) and OTU-based Venn Graph (B)

A1. 牧野湖; B1. 人民公园

A1. Muye Lake; B1. People's Park

出: 2 个水体的覆盖率指数均在 99.5% 以上, 说明此次测序比较接近样本真实情况。通过 Chao1、ACE、Shannon、Simpson 指数可知, 牧野湖的固氮微生物群落丰度和多样性均较高, 和 OTU 结果一致。

图 5A Rank Abundance 曲线表明: 牧野湖的曲线相对比人民公园的曲线宽, 说明牧野湖的物种组成比较丰富, 此结果与 ACE、Chao1 指数相一致。牧野湖 Rank Abundance 曲线平缓, 说明固氮微生物群落组成比较均匀, 固氮微生物群落种类相对较丰富。人民公园 Rank Abundance 曲线陡然下降, 说明物种多样性低, 但其中优势固氮微生物所占比例并不高。

图 5B 可知: 牧野湖和人民公园共有 OTU 103 个, 牧野湖特有 1099 个 OTU, 人民公园特有 97 个 OTU。牧野湖和人民公园共有 OTU 比较少, 说明 2 个水体物种组成差异性较大。牧野湖的特有 OTU 比较多, 说明牧野湖水体物种组成多样性更高。

2.6 水体固氮酶活检测

对野外采集的水样进行了原位培养, 并对其进行了气体采集, 运用乙炔还原法进行测定。对照组为固氮鱼腥藻 PCC7120, 培养条件相同。牧野湖和人民公园两个自然水体, 实验结果显示: 对照组鱼腥藻 PCC7120 能够将部分乙炔转化为乙烯(图 6A), 具有可检测的固氮酶活性, 2 个样品组在相同的条件下均未出现乙烯峰, 未表现出固氮活性(图 6B、6C)。推测在选取的样点中固氮活性较为微弱, 或固氮微生物并未表现出固氮能力。

3 讨论

目前, 水体富营养化形式依然较为严峻, 蓝藻水华在众多水体中存在, 长期的富营养化不仅对景观造成影响, 也对水体中的微生物等类群的演替产生影响^[15, 16]。固氮类微生物参与了地球上重要的氮素循环, 当环境中的氮源能够供给微生物生长, 固氮作用可能会降低, 相反, 当环境中缺乏氮源, 或者环境中的氮源无法满足微生物生长的时候, 固氮

表 5 固氮微生物群落Alpha多样性指数

Tab. 5 Alpha diversity indexes of nitrogen-fixing microbial community

采样点 Sampling site	观察的种类 Observed-species	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	Chao1指数 Chao1 index	ACE指数 ACE index	样品覆盖率 Goods-coverage
牧野湖 Muye Lake	1202	6.780	0.954	122.758	1215.831	0.999
人民公园 People's Park	200	2.034	0.521	219.375	218.047	1

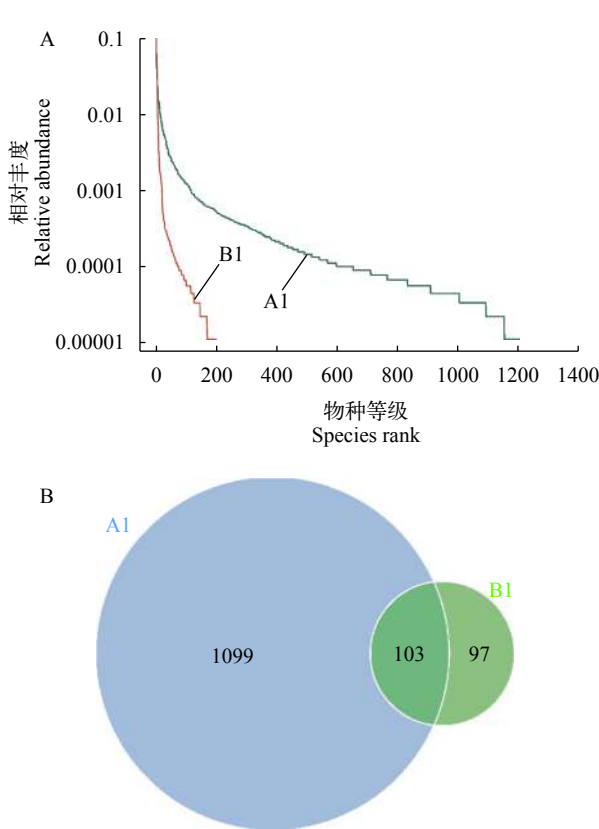


图 5 Rank Abundance曲线(A)与基于OTU的venn图(B)

Fig. 5 Rank Abundance Curve (A) and OTU-based venn Graph (B)

A1. 牧野湖; B1. 人民公园

A1. Muye Lake; B1. People's Park

类生物便会通过自身固氮系统进行^[17-19]。然而目前发现的固氮微生物主要是原核类的,其中蓝藻就是其中的一类,蓝藻中的固氮蓝藻能够利用大气中的氮合成自身生长所需的氮素,这一过程是一个主动耗能的过程,固定一分子的氮需要8个电子和消耗16个分子ATP^[3,20],因此,对于大部分具有固氮能力的蓝藻,在氮(铵态氮和硝态氮)满足的条件下,基本不发生固氮行为^[21]。有研究发现,固氮蓝藻能够降低湿地的除氮能力,其所固定的氮能够满足部分非固氮蓝藻的生长^[22],说明固氮蓝藻的固氮能力较强。在大型水体中,也发现固氮效率的时空特点及

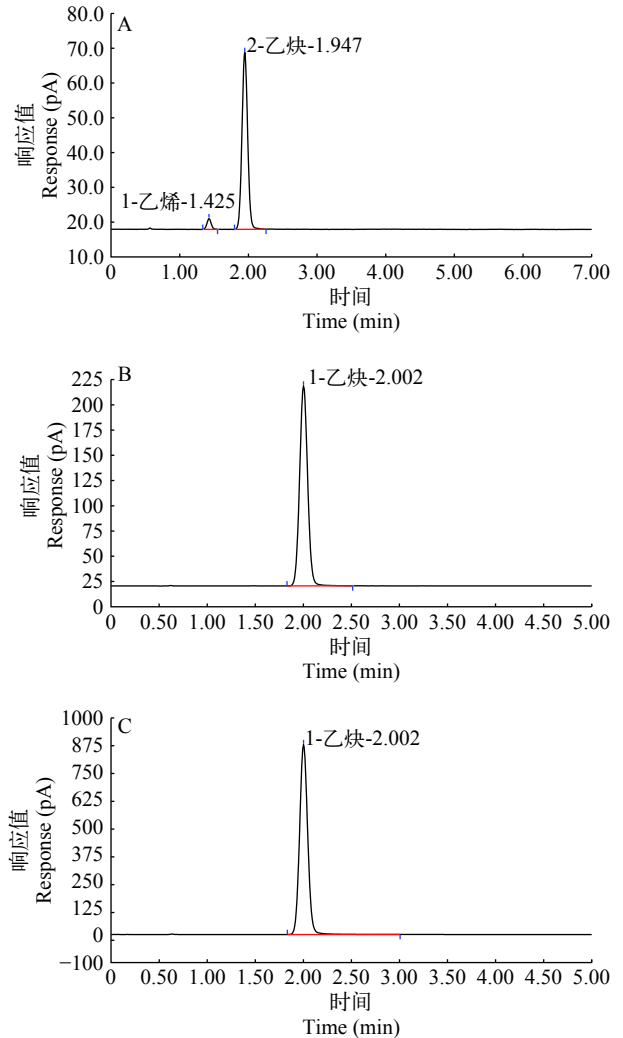


图 6 乙炔还原法测定固氮酶活性

Fig. 6 Determination of nitrogenase activity by acetylene reduction

A. 对照组PCC7120固氮活性; B. 牧野湖水体固氮活性检测; C. 人民公园水体固氮活性检测

A. Nitrogen fixation activity of PCC7120 in the control; B. Nitrogen fixation activity in the of Muye Lake; C. Nitrogen fixation activity in the water of People's Park

其环境影响因素。富营养化水体中的氮含量一般较高,太湖氮年均含量为1.79—3.63 mg/L^[23],在高氮的情况下,固氮微生物,尤其是固氮蓝藻的固氮效率及其固氮贡献如何,还不是很清楚。本研究

选取的两个水体,均处于富营养化状态,我们发现,固氮微生物类群(属)仍然占据一定比例(5%和24%),不同水体具有一定的差异,同时,我们还发现在这些固氮的类群中,固氮蓝藻的比例为(3%和9.3%),推测固氮蓝藻在富营养水体中对水体的氮的贡献较小。虽然由于理化条件的不同,两个水体的总的原核生物构成不相同,固氮微生物的种类和数量也不同,但固氮微生物在原核生物中的比例有共同趋势,相对含量较低。对水体的原位固氮率检测发现,在本研究的2个小型水体中,未检测出固氮酶活性,可能是水体的固氮活性较低,仪器未检测出。张波等^[6]研究发现固氮活性受温度影响较大,但本研究中水样的检测主要在夏季,因此,水温可能不是影响固氮活性的因素,这可能与景观水体受人影响较大有关,但通过本研究,我们得出在富营养水体中,固氮蓝藻对水体的氮贡献率较低。

参考文献:

- [1] Ma J M, Yang C, Jin P, *et al.* Spatial and temporal distribution dynamics of phytoplankton in Muye Lake and their relationship with environmental factors [J]. *Journal of Hydroecology*, 2014, **35**(5): 68—74 [马剑敏, 杨程, 靳萍, 等. 牧野湖浮游植物时空分布及水质分析. *水生生态学杂志*, 2014, **35**(5): 68—74]
- [2] Wang Y L, Liu Y, Pan W J, *et al.* Physiological characteristics of *Planktothrix spiroides*-A new species of bloom cyanophyta [J]. *Journal of Henan Normal University*, 2016, **44**(6): 130—134 [王钰亮, 刘洋, 潘文静, 等. 螺旋浮丝藻(*Planktothrix spiroides*)的生理特征研究. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2016, **44**(6): 130—134]
- [3] Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, **16**(5): 263—276
- [4] Paerl H W, Paul V J. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria [J]. *Water Research*, 2012, **46**(5): 1349—1363
- [5] Ye L L, Zhang M, Kong F X, *et al.* Progress and prospect of research on cyanobacteria nitrogen fixing in aquatic ecosystem [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2014, **26**(1): 9—18 [叶琳琳, 张民, 孔繁翔, 等. 水生生态系统蓝藻固氮作用研究进展与展望. *湖泊科学*, 2014, **26**(1): 9—18]
- [6] Zhang B, Zang L. Spatial-seasonal variations of nitrogen fixation of water column in Taihu Lake [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2016, **36**(4): 1129—1136 [张波, 张路. 太湖水体固氮速率时空变化. *环境科学学报*, 2016, **36**(4): 1129—1136]
- [7] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1997, **15**(1): 8—15
- [8] Yu Y, Lee C, Kim J, *et al.* Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction [J]. *Bio-technology & Bioengineering*, 2010, **89**(6): 670—679
- [9] Zehr J P, McReynolds L A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii* [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1989, **55**(10): 2522—2526
- [10] Lin L Y, Yin W L, Pan X Y, *et al.* The study of antural biofilm formation for nitrogen removal from aquaculture wastewater and analysis on microbial community in biofilm [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, **41**(6): 1327—1335 [蔺凌云, 尹文林, 潘晓艺, 等. 自然微生物挂膜处理水产养殖废水的效果及微生物群落分析. *水生生物学报*, 2017, **41**(6): 1327—1335]
- [11] Zhang X, Yan M C, Xiao G Q, *et al.* Analysis of microbial community structure in mangrove constructed wetland-mariculture coupling system [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(3): 557—564 [张翔, 闫茂仓, 肖国强, 等. 虾-贝-红树林耦合循环水养殖系统中微生物群落分析. *水生生物学报*, 2016, **40**(3): 557—564]
- [12] Stewart W D, Fitzgerald G P, Burris R H. In situ studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1967, **58**(5): 2071—2078
- [13] Kong F X, Song L R. Cyanobacterial Blooms: Forming Process and Environmental Characteristics [M]. Beijing: Science Press. 2011, 2—3 [孔繁翔, 宋立荣. 蓝藻水华: 形成过程及其环境特征研究. 北京: 科学出版社. 2011, 2—3]
- [14] Pan H, Liu Y R, Ma C X, *et al.* Characteristics and physical factors of cyanobacteria outbreak in northern cold region inland alkaline water [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2017, **45**(7): 79—83 [潘翰, 刘琰冉, 马成学. 北方寒冷内陆碱性水体蓝藻暴发特点及影响因素. *东北林业大学学报*, 2017, **45**(7): 79—83]
- [15] Yang Z, Zhang M, Shi X, *et al.* Nutrient reduction magnifies the impact of extreme weather on cyanobacterial bloom formation in large shallow Lake Taihu (China) [J]. *Water Research*, 2016, **103**: 302—310
- [16] Liu Y, Xu Y, Wang Z, *et al.* Dominance and succession of *Microcystis* genotypes and morphotypes in Lake Taihu, a large and shallow freshwater lake in China [J]. *Environmental Pollution*, 2016, **219**: 399—408
- [17] Stein L Y, Klotz M G. The nitrogen cycle [J]. *Current Biology*, 2016, **26**(3): R94—R98
- [18] Hemp J, Lucker S, Schott J, *et al.* Genomics of a phototrophic nitrite oxidizer: insights into the evolution of photosynthesis and nitrification [J]. *The ISME Journal*, 2016, **10**(11): 2669

- [19] Thomas R Q, Brookshire E N J, Gerber S. Nitrogen limitation on land: how can it occur in Earth system models [J]. *Global Change Biology*, 2015, **21**(5): 1777—1793
- [20] Farnelid H, Turk-Kubo K, del Carmen Muñoz-Marín M, *et al.* New insights into the ecology of the globally significant uncultured nitrogen-fixing symbiont UCYN-A [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2016, **77**(3): 125—138
- [21] Kalff J. Limnology. Inland Water Ecosystems [M]. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. 2002, 592
- [22] Zhang X D, Pan X, Ma M Y, *et al.* Contribution of nitrogen fixation by cyanobacteria to particulate organic nitrogen in a constructed wetland [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2017, **36**(2): 295—302 [张骁栋, 潘旭, 马牧源, 等. 蓝藻固氮对人工湿地颗粒物有机氮的贡献. 生态学杂志, 2017, **36**(2): 295—302]
- [23] Dai X L, Qian P Q, Ye L, *et al.* Changes in nitrogen and phosphorus concentrations in Lake Taihu, 1985-2015 [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2016, **28**(5): 935—943 [戴秀丽, 钱佩琪, 叶凉, 等. 太湖水体氮、磷浓度演变趋势 (1985-2015年). 湖泊科学, 2016, **28**(5): 935—943]

THE DIVERSITY OF DIAZOTROPH AND THE ACTIVITY OF NITROGEN FIXATION IN URBAN LANDSCAPE WATER

LU Han-Yang, PAN Wen-Jing, MA Xiao-Jie, LI Qin and LIU Yang
(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: This study explored the nitrogen-fixing microbial community structure, diversity and nitrogen fixation activity in urban landscape water body, and the nitrogen-fixing contribution of nitrogen-fixing cyanobacteria in water from Muye Lake and People's Park in Xinxiang city. Physical and chemical indicators are eutrophic in these two lakes. This study measured 16S rDNA and Nitrogenase *nifH* gene of microorganism by high-throughput sequencing, and determined nitrogen fixation rate of nitrogen fixing microorganisms in two lakes by the acetylene reduction assay. A total of 32 phyla and 275 genera were detected in the prokaryote groups, and a total of 9 phyla and 66 genera were detected in the nitrogen-fixing microorganisms in Muye Lake. A total of 31 phyla and 238 genera were detected in the prokaryote groups; a total of 4 phyla and 13 genera were detected in the nitrogen-fixing microorganisms in the water column of the People's Park. Nitrogen-fixing cyanobacteria accounted for 3% in the Muye Lake and 9.3% in People's Park. The richness of Nitrogen-fixing microorganisms in Muye Lake was significantly higher than that of People's Park. The nitrogen fixation activity in the two lakes was similar. It is speculated that nitrogen fixation activity may be inhibited in eutrophic water.

Key words: Landscape water column; Nitrogen-fixing microbe; Cyanobacteria; High-throughput sequencing; Acetylene reduction assay