

珠江口表层沉积物 nirS 型反硝化微生物多样性*

高志强^{1,2} 朱玲² 朱伟¹ 柳淑芳² 范艳君^{1,2} 庄志猛²

(1. 青岛农业大学生命科学学院 青岛 266109; 2. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室
山东省渔业资源与生态环境重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 本研究以 nirS 基因为分子标记, 将 PCR、克隆文库构建与测序和典范对应分析相结合, 对珠江口表层沉积物 nirS 型反硝化微生物的群落多样性进行了研究。3 个站位共获得 180 个 nirS 基因克隆子, 隶属于 62 个 OTUs, 氨基酸序列的相似性在 50%—100% 之间。各站位 OTU 分布格局差异明显, 范围在 19—33 之间, 表现出高度的多样性。系统进化分析表明, 62 个 OTUs 形成了 5 个类群, 分别与河口、海洋沉积物、海岸养殖排放废水、富营养化海湾及海水养殖沉积物等的反硝化微生物聚类在一起, 表明珠江口作为海淡水交汇区具有独特的反硝化微生物群落分布格局, 同时也指示了珠江口氮污染及富营养化程度。典范对应分析结果表明, 盐度、氮相关营养盐水平(PON/TN、NH₄-N、NO₂-N 和 NO₃-N)可能是影响其分布格局的重要因素。

关键词 nirS 基因; 反硝化微生物, 多样性, 沉积物, 珠江口
中图分类号 X511

反硝化作用是微生物在厌氧环境下, 利用硝酸根作为电子受体, 将其还原为气体(NO, N₂O 和 N₂)的生物化学过程。作为河口氮生物地球化学循环的重要组成部分, 反硝化作用具有重要的生物学和生态学意义。一方面, 反硝化作用将无机氮转变成气态氮扩散到大气中, 从而将沉积物、水体和大气联系起来, 是联结河口生态系统和大气氮的纽带(Galloway *et al.*, 2008)。另一方面, 反硝化作用在调节和控制河口富营养化进程中发挥重要作用, 是去除河口“过量”氮素的最主要方式(Khalil *et al.*, 2002)。然而, 反硝化作用也是温室效应气体 NO 和 N₂O 产生的主要原因, 这些气体引起全球气候变暖并破坏臭氧层结构(Khalil *et al.*, 2002)。驱动反硝化作用的微生物被称为反硝化微生物, 了解反硝化微生物的群落组成和结构特点是研究河口反硝化作用的关键环节之一。

珠江口是珠江流域的主要入海口, 也是南海与华南大陆的耦合带。已有研究表明, 珠江口及其南海近岸氮污染严重(贾国东等, 2002), 富营养化程度高

(Zhang *et al.*, 2002), NO 和 N₂O 排放逐年增加(岳维忠等, 2007), 已成为全球河口反硝化作用发生程度较高的地区之一(Harrison *et al.*, 2008)。虽然近年来关于珠江口反硝化作用的研究逐步开展(徐继荣等, 2005), 但关于反硝化微生物群落结构的研究还鲜有报道。血红素亚硝酸还原酶(nirS)是反硝化作用区别于其它硝酸盐代谢的标志性酶之一, 1998 年, Braker 等首次以 nirS 基因为分子标记, 通过设计不同引物组合, 结合 PCR 与测序技术, 成功检测了分离培养的反硝化微生物菌株, 并将这种方法应用于环境样品反硝化微生物的检测(Braker *et al.*, 1998)。目前, 这种方法已被用于海洋沉积物(Bulow *et al.*, 2008)、活性污泥(Mounier *et al.*, 2004)、土壤(Otsuka *et al.*, 2008)、水体(Yoshie *et al.*, 2004)等反硝化微生物的研究。本文以 nirS 基因为分子标记, 结合 PCR、克隆文库构建和测序技术, 研究了珠江口表层沉积物 nirS 型反硝化微生物多样性及系统进化关系, 探讨了影响珠江口 nirS 型反硝化微生物群落分布格局的主要影响因子。

* 国家自然科学基金资助项目, 40776090 号, 40976073 号。高志强, E-mail: kuper198488@163.com

通讯作者: 朱玲, 博士, 副研究员, E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2011-05-23, 收修改稿日期: 2011-10-10

1 材料与方 法

1.1 沉积物样品采集与理化因子分析

2007 年 12 月沿珠江口盐度梯度选取 3 个站位(图 1、表 1), 采用无干扰多管柱状采泥器采集沉积物样品。将 0—2cm 表层样品均匀混合, 分别用灭菌的 50ml 聚丙烯管收集, 一份保存于 4℃ 冰箱中, 用于沉积物样品的理化因子测定; 另一份保存于 -20℃ 冰箱中, 用于沉积物基因组 DNA 提取。每个站位设置 3 个重复。

沉积物样品 7000r/min 离心 20min 获得上清液, 用 GF/F 玻璃纤维滤膜过滤后用于营养盐分析和盐度测定。营养盐测定方法参照《海洋监测规范》(中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局等, 2008)进行: 磷酸盐($\text{PO}_4\text{-P}$)采用磷钼蓝法测定; 氨氮($\text{NH}_4\text{-N}$)采用次溴酸盐氧化法测定; 亚硝酸盐($\text{NO}_2\text{-N}$)采用萘乙二胺法测定; 硝酸盐($\text{NO}_3\text{-N}$)采用镉柱还原法测定; 用元素分析仪 PE 2400 分析沉积物中颗粒有机氮 (PON)含量, 计算 PON 占总氮的百分比。

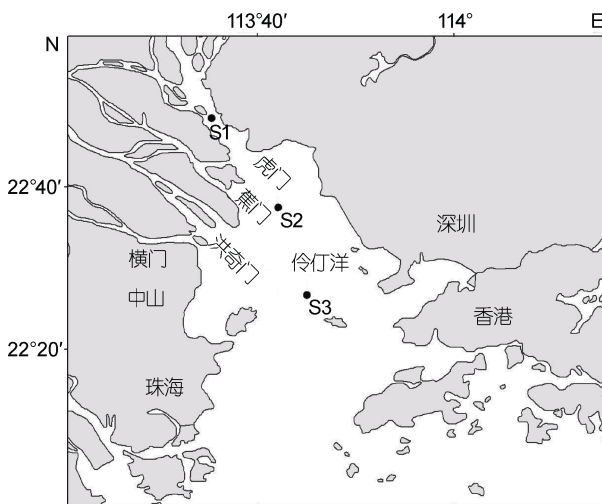


图 1 珠江口采样站位示意图

Fig.1 Map showing the sampling stations in the Pear River Estuary

1.2 DNA 提取与纯化

DNA 提取参照 Zhou 等(1996)的方法, 进行了适当修改, 步骤如下: (1) 称取 0.4g 沉积物, 加入 0.6ml 清洗液[50mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 200mmol/L NaCl, 5mmol/L Na_2EDTA , 1% CTAB, 1% PVPP], 振荡混匀, 55℃ 水浴 5min 后, 离心去上清, 重复 2 次; (2) 加入 0.4ml DNA 提取液[100mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 100mmol/L Na_2EDTA , 100mmol/L Na_3PO_4 (pH 8.0),

1.5mol/L NaCl, 1% CTAB, 1% PVPP], 震荡混合后 37℃ 水浴 30min, 然后加入 80 μl 10% SDS, 4 μl 蛋白酶 K, 55℃ 水浴 2h; (3) 加入 1/2 体积 4.5mol/L 的 NaCl, 混合均匀后, 再加入等体积的氯仿-异戊醇(24 : 1), 轻微震荡 15min 后, 12000r/min 离心 5min, 取上清; (4) 加入 0.6 体积的异丙醇, 混匀, 室温静置 15min 后, 12000r/min 离心 15min, 超纯水溶解沉淀。溶解的 DNA 经 1.5% 琼脂糖电泳检测。

1.3 nirS 基因克隆文库构建

以纯化的 DNA 为模板, cd3aF(5'-GT(C/G)AACC T(C/G)AAGGA(A/G)AC(C/G)GG-3') 和 R3cd(5'-GA (C/G)TTCGG(A/G)TG(C/G)GTCTTGA-3') 为引物进行 PCR 扩增, 扩增的 nirS 基因片段长度约 425bp。25 μl 的 PCR 反应体系包括: 2.5 μl 10 \times PCR buffer, 1.5 μl MgCl_2 (25mmol/L), 2 μl dNTP (25mmol/L), 1 μl 引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 0.2 μl (1U) *Taq* polymerase, 1 μl DNA 模板, 15.8 μl PCR 水。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 34s, 54℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 45s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。

将每个站位三个重复样品的 PCR 产物混合, 切胶纯化, 与 pMD18-T (Takara)载体连接后, 转化到大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中, 构建 nirS 基因克隆文库。

1.4 测序与系统发育分析

每个站位通过“蓝白斑”筛选随机检出 100 个白色菌落, 利用载体通用引物 M13F/M13R 进行菌落的 PCR 筛选, 去除假阳性和非目标克隆后, 选取 65 个阳性克隆进行测序。

序列相似性搜索通过 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 Blastx 程序进行, 选取相似性最高的序列作为构建系统进化树的参照序列。利用 EBI 的 ClustalW2 程序 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)和 MEGA 4.0 软件, 采用 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树, 进行系统发育分析。

1.5 nirS 基因克隆文库分析

利用 DOTUR 软件将相似性 95% 的 nirS 基因序列归为同一个操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTUs), 并估算每个克隆文库 nirS 基因丰富度指数 Chao 和 ACE, 多样性指数 Shannon-Weiner (H') 和 Simpson ($1/D$)。

覆盖百分率 (Coverage, C) 通过公式 $C = [1 - (n1/N)] \times 100$ 计算, 其中 $n1$ 表示克隆文库中仅出现一次的 OTU 数目, N 表示每个克隆文库的克隆总数。利用

Rarefaction Calculator 软件(<http://www.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php>)绘制 Rarefaction 稀释曲线。

1.6 典范对应分析(Canonical Correspondence Analysis, CCA)

采用 Canoco for Windows 4.5 软件对 OTUs 数据和环境数据进行 CCA 分析。排除在三个站位中只出现一次的 OTU。OTUs 数据和环境数据经过 $\lg(x+1)$ 转换, 用 WCanImp 分别将其生成名为 OTU.dta 和 env.dta 的文件, 应用 Canoco Windows 4.5 进行运算, 用 Canodraw for Windows 作图。

2 结果与分析

2.1 沉积物样品的理化性质

表层沉积物理化性质见表 1。根据水体盐度, 通常将河口划分为淡水区($S < 0.5$)、海淡水混合区($0.5 < S < 25$)和海水区($S > 25$)。由于采样时间恰逢珠江口咸潮, 使本来处于淡水区和海淡水混合区分界线附近的 S1 站位盐度升高了近 20 倍, S2 站位也由低盐混合区变成了高盐混合区(殷建平, 2006)。从总体趋势看, 沿入海口方向, 盐度呈梯度递减, S1 站位的 TIN、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4\text{-P}$ 浓度均最高, S2 最低; 但 PON/TN 在 S2 最高, S3 最低。与世界各海域、海湾和河口相比, 珠江口 TIN(93.39—166.46)和 N/P(46.27—63.54)明显偏高, 说明珠江口富营养化程度较高。

表 1 采样站位的经纬度及理化性质

Tab.1 Longitude, latitude and physicochemical characteristics of sampling sites

| 经纬度及理化性质 | S1 | S2 | S3 |
|--|--------|--------|--------|
| 纬度(°N) | 22.81 | 22.70 | 22.62 |
| 经度(°E) | 113.60 | 113.68 | 113.73 |
| 盐度 | 10.63 | 24.99 | 30.42 |
| $\text{NH}_4\text{-N}$ ($\mu\text{mol/L}$) | 56.14 | 25.41 | 44.03 |
| $\text{NO}_2\text{-N}$ ($\mu\text{mol/L}$) | 6.18 | 3.50 | 4.02 |
| $\text{NO}_3\text{-N}$ ($\mu\text{mol/L}$) | 104.14 | 65.48 | 81.04 |
| $\text{PO}_4\text{-P}$ ($\mu\text{mol/L}$) | 2.62 | 2.04 | 2.27 |
| TIN | 166.46 | 94.39 | 129.09 |
| N/P (TIN/ $\text{PO}_4\text{-P}$) | 63.54 | 46.27 | 56.87 |
| PON/TN (%) | 0.90 | 1.11 | 0.69 |

2.2 nirS 基因克隆文库分析

测序的 195 个阳性克隆子共获得 180 个有效的 nirS 基因序列, 每个站位 60 个。利用 DOTUR 分析软件, 将序列相似性 95% 定义为同一 OTU, 可将 180

个 nirS 序列归属于 62 个 OTU 类型。每个站位 nirS 克隆文库的 OTUs 数目、分布及包含的克隆子数目如图 2 所示。在 3 个站位中, S1 含有 OTU 类型最多(33 个), 单克隆子 OTU 类型也最多(24 个), 占 S1 总克隆数的 40%。但 S1 没有明显的优势种群, 只有两个数量相等的次优势种群, 均含有 9 个克隆子, 分别占 S1 总克隆数的 15%。S2 和 S3 分别含有 19 个和 23 个 OTU 类型, 单克隆子的 OTU 类型分别为 13 个和 16 个, 分别占 S2 和 S3 总克隆数的 21.67% 和 26.67%。两个站位各自具有独特的优势种群, 对应的 OTU 类型分别含有 24 个和 20 个克隆子, 占 S2 和 S3 总克隆数的 40% 和 33.33%。同时还有数量不等的次优势种群, 分别占 S2 和 S3 总克隆数的 6.67%—13.33% 和 8.33%—11.67%。三个站位共有的 OTUs 类型有 2 个(OTU1 和 OTU2): OTU2 是三个站位共有的次优势种群; OTU1 既是 S1、S2 共有的次优势种群, 也是 S3 的优势种群。

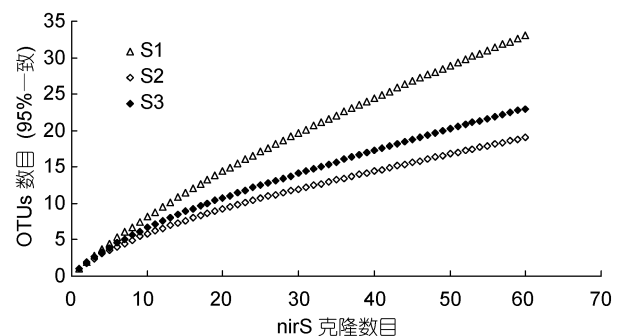


图 2 珠江口沉积物 nirS 型反硝化微生物稀释曲线

Fig.2 Rarefaction curves of the nirS-type clones from sediments of the Pear River Estuary

2.3 nirS 基因文库多样性分析

每个站位 OTUs 类型数目、文库覆盖百分率 C 、丰富度指数 Chao 和 ACE、多样性指数 H' 和 $1/D$ 的分析结果见表 2, Rarefaction 稀释曲线分析见图 3。覆盖百分率越高, 表明文库表达真实环境中 nirS 基因群落结构的置信度越高。3 个站位 nirS 基因文库的覆盖百分率在 45.0%—68.3% 之间, S2 最高(68.3%), S1 最低(45.0%), 但均没有达到饱和, 表明每个站位 60 个克隆子的库容还不能完全反映各站位 nirS 基因的群落结构。进一步分析 Rarefaction 稀释曲线也表明, S2 已逐渐接近平台期, 接近饱和, 但 S1 还远没有到达平台期。这些结果也说明珠江口表层沉积物中 nirS 型反硝化微生物多样性非常高。

表 2 珠江口沉积物 nirS 基因克隆文库覆盖百分率、丰富度指数与多样性指数

Tab.2 The calculations of the coverage, richness estimators and diversity indices of the nirS-type clone libraries constructed from sediments of the Pear River Estuary

| 站位 | nirS 克隆数 | OTUs 数目 | C(%) | Chao | ACE | H' | 1/D |
|----|----------|---------|------|-------------------|---------------------|---------------|------------------|
| S1 | 60 | 33 | 45.0 | 79.1 (49.1/164.9) | 273.0 (196.6/385.1) | 3.1 (2.9/3.4) | 20.0 (12.5/50.0) |
| S2 | 60 | 19 | 68.3 | 58.0 (29.1/169.8) | 104.8 (65.8/176.1) | 2.2 (1.9/2.5) | 5.3 (3.7/10.0) |
| S3 | 60 | 23 | 61.7 | 53.2 (31.7/126.2) | 130.7 (84.3/211.9) | 2.5 (2.2/2.8) | 7.1 (5.0/14.3) |

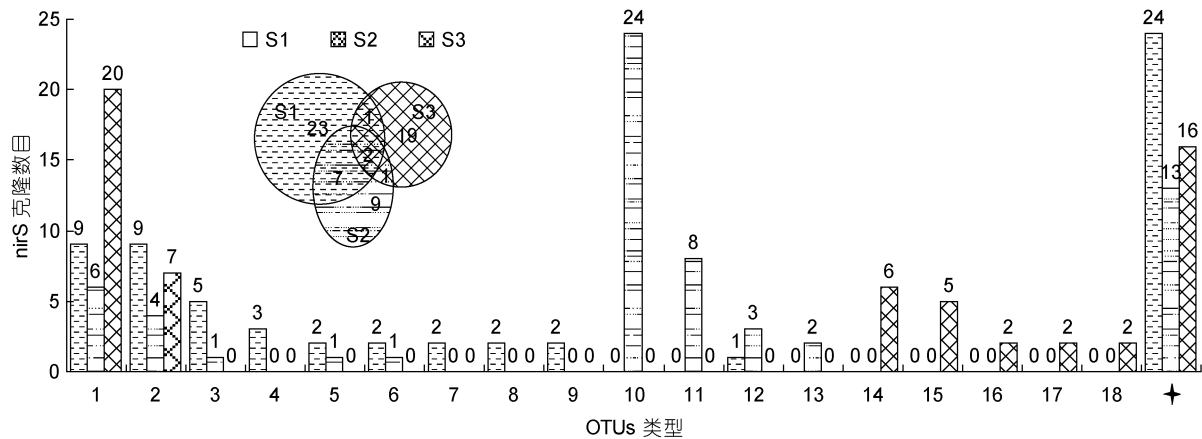


图 3 珠江口沉积物 nirS 基因克隆文库 OTUs 的分布图谱

Fig.3 OTUs patterns of the nirS-type clone libraries constructed from sediments of the Pear River Estuary

注: “十字星符号”表示各站位单克隆 OTU 类型总数

在文库库容相同的情况下,覆盖百分率越高,nirS 基因群落的多样性越低。在 3 个 nirS 基因文库中,S2 覆盖百分率最高(68.3%),但 OTUs 数目最低(19),除丰富度指数 Chao(58.0)略高于 S3(53.2)外,丰富度指数 ACE(104.8)与多样性指数 H' (2.2)和 $1/D$ (5.3)也是 3 个站位中最低的。S1 覆盖百分率最低(45.0%),但 OTUs 数目最高(33),丰富度指数 Chao(79.1)和 ACE(273.0)与多样性指数 H' (3.1)和 $1/D$ (20.0)也是 3 个站位中最高的。

2.4 典范对应分析

典范对应分析是一种非线性多元直接梯度分析方法,在由主轴 1 和主轴 2 构成的排序图(图 4)中,环境因子用带有箭头的线段表示,向量长短代表了其在主轴中的作用,箭头所处象限表示环境因子与排序轴之间相关性的正负。图 4 反映了珠江口沉积物 nirS 型反硝化微生物群落组成、结构沿环境梯度变化的趋势。第一、第二排序轴间的相关系数都为 0,说明排序结果是可信的。在 CCA 排序图中,与第一排序轴(水平)关系最大的是盐度(0.85)和 PON/TN(0.642),前者为正相关,后者为负相关;其次为 $\text{NO}_2\text{-N}$ (0.392)和 $\text{NO}_3\text{-N}$ (0.282),均为负相关。与第二排序轴(垂直)关系最大的是 $\text{NH}_4\text{-N}$ (0.998)、 $\text{NO}_2\text{-N}$ (0.920)、 $\text{NO}_3\text{-N}$

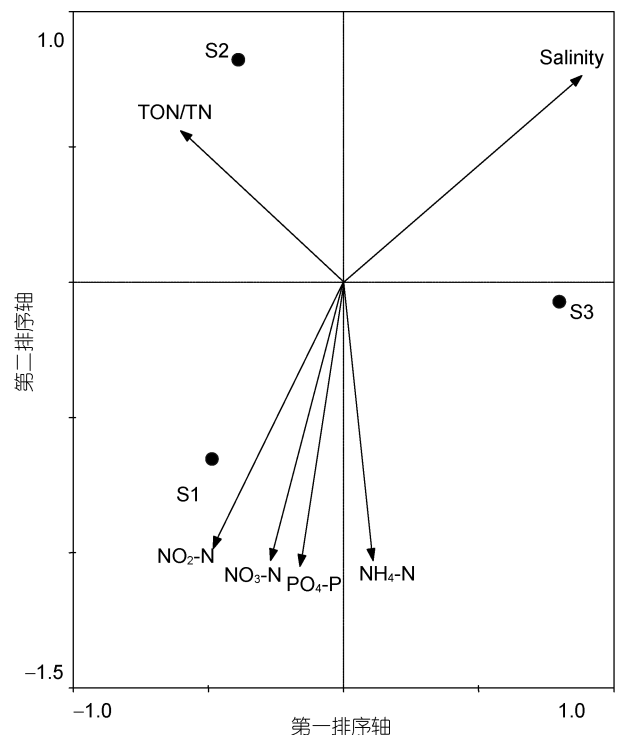


图 4 珠江口沉积物 nirS 型反硝化微生物 OTUs 与环境关系的 CCA 排序图

Fig.4 CCA biplot of the nirS-type OTUs and environmental variables from sediments of the Pear River Estuary

(0.984)和 $\text{PO}_4\text{-P}$ (0.983), 均为负相关, 其次为盐度(0.662)和 PON/TN (0.542), 均为正相关。图 4 反映了沿盐度梯度, nirS 型反硝化微生物群落分布格局对栖息环境适应对策的差异。三个站位的 nirS 型反硝化微生物在生态适应上既有重叠现象, 又表现出对各自栖息生境的特殊适应特点, 盐度、氮相关营养盐水平可能是影响其分布格局的重要因素。

2.5 nirS 基因的系统发育分析

利用 EBI 的 ClustalW2 程序对所有 nirS 氨基酸序列进行同源性比对分析发现, 序列之间相似性为 50%—100%, 表现出高度的多样性。随机选取 OTU 类型所包含的一个序列, 通过 GenBank 的 Blastx 程序进行相似性搜索, 在数据库中没有找到完全相同的序列, 说明这些 nirS 基因序列可能是以前研究没有被发现的。在 GenBank 中选取部分相似性最高的序列与所有 OTU 类型随机序列一起, 利用 ClustalW2 程序和 MEGA 4.0 软件构建系统进化树如图 5 所示。

从图 5 可以看出, 所有 nirS 序列形成了 5 个类群: 其中, 总克隆的 41.11% 分布在第一个类群, 主要包括 S2 的优势种群(S2: 24)、3 个采样点的次优势种群(如: S1: 9; S2: 8; S3: 7)等, 在系统进化树中, 这些序列与已知的海洋沉积物 γ -proteobacteria 的反硝化菌株、河口和海湾沉积物中未培养的反硝化微生物聚类在一起。25% 的克隆分布在第二个类群, 主要包括 S3 的优势种群(S3: 20)和 S1、S2 的次优势种群(如: S1: 9; S2: 6), 与这些序列聚在一起的是已知的海岸养殖排放废水的 *Pseudomonas aeruginosa* 和海岸带水体未培养的反硝化微生物。每个样品各有 6 个克隆分布在第

类群, 并且大部分 OTU 类型为单克隆, 这些序列与富营养化海湾、河口和海洋沉积物未培养的反硝化微生物聚在一起, 亲缘关系较近。第三类群中, S1 站位的克隆占大部分(总克隆的 68%), 且大部分为单克隆 OTU 类型, 这些序列除了与海岸带、海湾沉积物未培养的反硝化微生物聚类在一起, 还与湖泊水体未培养反硝化微生物具有较近的亲缘关系。第四类群包含的克隆数最少(7.78%), 这些克隆与海湾、海水养殖沉积物和土壤中未培养的反硝化微生物具有较近的亲缘关系。

3 讨论

沉积物 DNA 提取是河口微生物分子生态学研究必不可少的环节, 获取足够数量和纯度的 DNA 样品是后续分子生物学技术实施的必要保证。与其它样品

DNA 提取相比, 如何分离、去除与沉积物结合的大量腐殖酸(Humic acids), 是困扰河口沉积物 DNA 提取的瓶颈。腐殖酸拥有各种环状结构, 富含多种活性官能团, 具有极性、氧化还原性、络合和吸附等多重理化性质(Alm *et al*, 2000)。在沉积物 DNA 提取过程中, 腐殖酸不但可以阻止 SDS 等变性剂渗透、抑制溶菌酶、蛋白酶 K 的活性, 影响裂解缓冲液对微生物的裂解, 还表现出与 DNA 相似的沉积行为, 进而影响后续的 PCR 扩增、转化等(Jackson *et al*, 1997)。已有研究表明, 在抽提液中加入高盐可以大大降低腐殖酸的干扰, 加入 PVPP 和 CTAB 能够有效吸收腐殖酸及酚类等化合物(Robe *et al*, 2003)。但如果提取的样品量过大, 即使在提取过程中加入高盐、PVPP 和 CTAB, 获得的 DNA 也无法直接进行 PCR 扩增, 必须经过进一步纯化(赵晶等, 2003)。而琼脂糖凝胶电泳、分子筛凝胶层析等纯化方法操作复杂, 回收率低, 将导致 DNA 损失量大, 提取成本倍增(Miller *et al*, 1999)。本实验室通过反复摸索, 将高盐沉淀 CTAB 法与 PVPP 法有机结合, 不但获得了足够数量的 DNA, 而且纯度较高, 不需要纯化就可进行 PCR 扩增、克隆文库构建等分子生物学操作。作者也尝试了将这种方法用于贝类生物沉积物、网箱养殖区沉积物等高腐殖酸样品的 DNA 提取, 效果良好。

国际上关于河口反硝化作用的研究始于 20 世纪 70 年代, 主要侧重于水体和沉积物中不同形态氮分布和变化规律、反硝化速率水平及其影响因素等(Kuypers *et al*, 2005)。在对某一河口反硝化作用强度进行预测与评估时, 常因为不确定因素太多而出现一个甚至几个数量级的差异(Middleburg *et al*, 1996)。反硝化微生物功能群, 作为反硝化作用的驱动泵, 其群落组成和结构对栖息环境的响应, 可能对解析和评估河口反硝化作用发挥重要作用。已有研究显示, nirS 型反硝化微生物在河口、海湾和海岸带区域表现出较高的多样性, 其群落组成和结构与采用站位的特有的理化因子有关(Wallenstein *et al*, 2006; Jayakumar *et al*, 2004)。在墨西哥海岸厌氧区沉积物, nirS 型反硝化微生物多样性与地理位置和栖息环境相关, 硝酸盐和溶解氧浓度是影响其群落结构的重要因素(Wallenstein *et al*, 2006)。而对阿拉伯海岸的研究发现, nirS 型反硝化微生物多样性与亚硝酸盐水平正相关, 在亚硝酸盐浓度高的站点, nirS 基因的多样性也最高, 反之亦然(Jayakumar *et al*, 2004)。本文对珠江口沉积物 nirS 型反硝化微生物群落与环境因子进行了典范

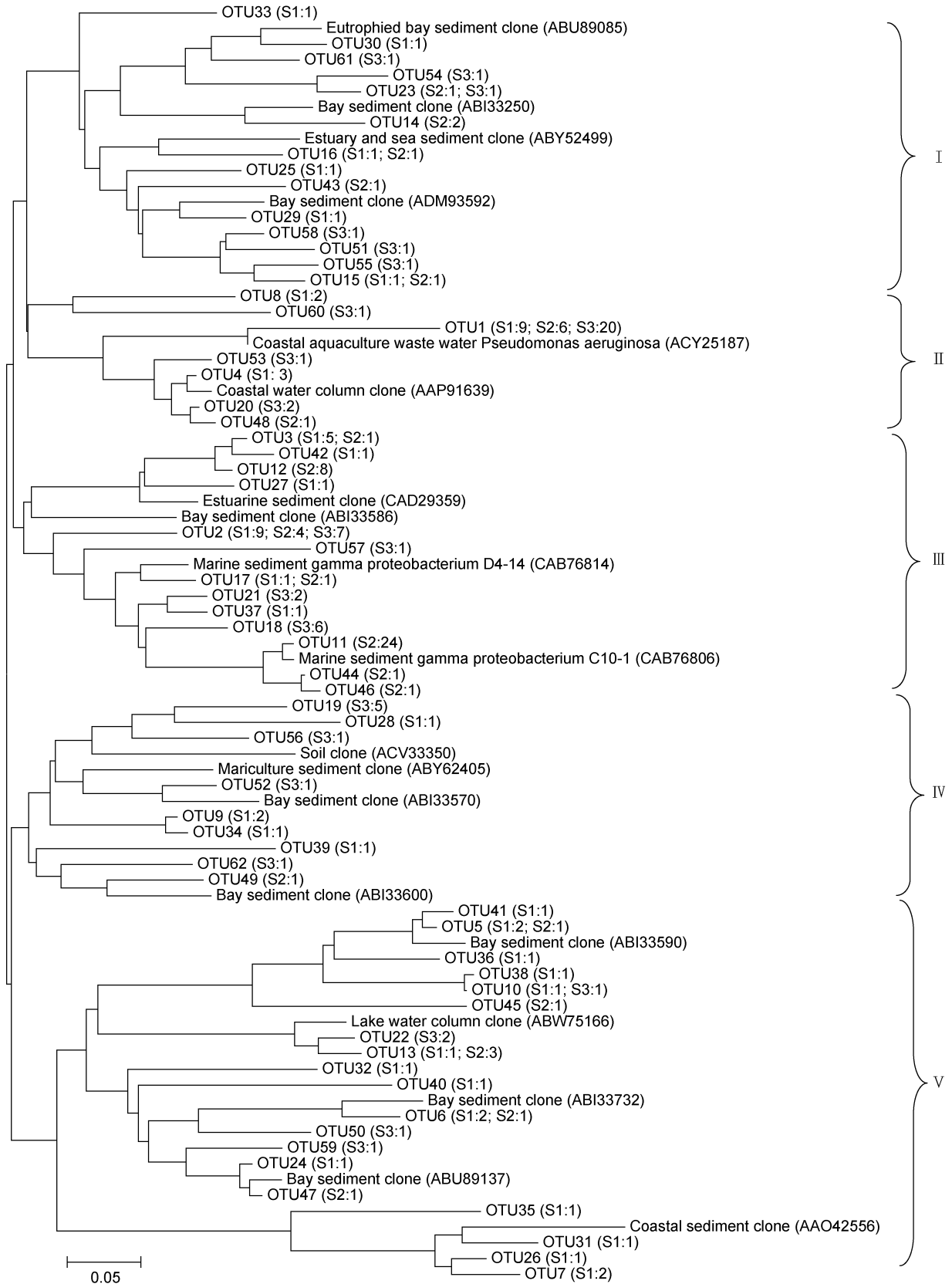


图 5 珠江口沉积物 nirS 序列的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of nirS sequences from sediments of the Pear River Estuary

对应分析, 结果表明, 盐度和各种形态氮营养盐浓度 ($\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3\text{-N}$) 是影响珠江口沉积物微生物群落分布格局的重要因素, 但不同站位具有不同的主要影响因子。典范对应分析不同于以前的直接梯度分析, 它将对应分析与多元回归相结合, 综合了多个环境因子, 包含的信息量大, 结果直观明显 (ter Braak *et al*, 2002), 直接揭示了珠江口沉积物 nirS 型反硝化微生物群落对环境因子的响应, 在一定程度上反映了不同区域珠江口沉积物反硝化作用水平, 同时也为河口微生物分子生态学研究提供了一种新的工具。

参 考 文 献

- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会, 2008. 海洋监测规范 (GB17378.4-2007). 北京: 中国标准出版社, 101—103
- 岳维忠, 黄小平, 孙翠慈, 2007. 珠江口表层沉积物中氮、磷的形态分布特征及污染评价. 海洋与湖沼, 38(2): 111—117
- 赵 晶, 张 锐, 林念炜等, 2003. 深海沉积物中微量 DNA 的提取及应用. 海洋与湖沼, 34(3): 313—321
- 贾国东, 彭平安, 傅家谟, 2002. 珠江口近百年来富营养化加剧的沉积记录. 第四纪研究, 22(2): 158—165
- 徐继荣, 王友绍, 殷建平, 2005. 珠江口入海河段 TIN 形态转化与硝化和反硝化作用. 环境科学学报, 25(5): 686—692
- 殷建平, 王友绍, 徐继荣等, 2006. 特大咸潮对珠江入海河段环境要素的影响. 热带海洋学报, 25(4): 79—84
- Alm E W, Zheng D, Raskin L, 2000. The presence of humic substances and DNA in RNA extracts affects quantitative hybridization results. Appl Environ Microbiol, 66(10): 4547—4554
- Braker G, Fesefeldt A, Witzel K P, 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (nirK and nirS) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. Appl Environ Microbiol, 64: 3769—3775
- Bulow S E, Francis C A, Jackson G A *et al*, 2008. Sediment denitrifier community composition and nirS gene expression investigated with functional gene microarrays. Environmental Microbiology, 10: 3057—3069
- Galloway J N, Townsend A R, Erisman J W *et al*, 2008. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions and potential solutions. Science, 320: 889—892
- Harrison P J, Yin K D, Lee J H W *et al*, 2008. Physical-biological coupling in the Pearl River Estuary. Cont Shelf Res, 28: 1405—1415
- Jackson C R, Harper J P, Willoughby D *et al*, 1997. A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. Appl Environ Microbiol, 63: 4993—4995
- Jayakumar D A, Francis C A, Naqvi S W A *et al*, 2004. Diversity of nitrite reductase genes (nirS) in the denitrifying water column of the coastal Arabian Sea. Aquatic Microbial Ecology, 34: 69—78
- Khalil M A K, Rasmussen R A, Shearer M J, 2002. Atmospheric nitrous oxide: patterns of global change during recent decades and centuries. Chemosphere, 47: 807—821
- Kuypers M M M, Lavik G, Woebken D *et al*, 2005. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. Proceedings of National Academy of Science, 102: 6478—6483
- Middleburg J J, Soetaert K, Herman P M J *et al*, 1996. Denitrification in marine sediments: a model study. Global Biogeochemical Cycles, 10: 661—671
- Miller D N, Bryant J E, Madsen E L *et al*, 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. Appl Environ Microbiol, 65: 4715—4724
- Mounier E, Hallet S, Cheneby D *et al*, 2004. Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. Environ Microbiol, 6: 301—312
- Otsuka S, Sudiana I, Komori A *et al*, 2008. Community structure of soil bacteria in a tropical rainforest several years after fire. Microbes and Environments, 23: 49—56
- Robe P, Nalin R, Capellano C *et al*, 2003. Extraction of DNA from soil. Eur J Soil Biol, 39: 183—190
- ter Braak C J F, Šmilauer P, 2002. CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power (Ithaca NY, USA), 1—500
- Wallenstein M D, Myrold D D, Firestone M *et al*, 2006. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. Ecol Appl, 16: 2143—2152
- Yoshie S, Noda N, Tsuneda S *et al*, 2004. Salinity decreases nitrite reductase gene diversity in denitrifying bacteria of wastewater treatment systems. Appl Environ Microbiol, 70: 3152—3157
- Zhang J, Liu C L, 2002. Riverine composition and estuarine geochemistry of particulate metals in China-weathering features, anthropogenic impact and chemical fluxes. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 54: 1051—1070
- Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M, 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl Environ Microbiol, 62: 316—322

DIVERSITY OF DENITRIFYING BACTERIA BY ENCODING nirS GENE FROM SURFACE SEDIMENTS OF THE PEAR RIVER ESTURARY

GAO Zhi-Qiang^{1,2}, ZHU Ling², ZHU Wei¹, LIU Shu-Fang²,
FAN Yan-Jun^{1,2}, ZHUANG Zhi-Meng²

(1. *College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao, 266109*; 2. *Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Aquaculture, Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-environment, Shandong Province, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract Diversity of denitrifying bacteria by encoding nirS gene from surface sediments and the major contributing parameter from environment in the Pear River were studied using PCR, clone library construction, sequencing and canonical correspondence analysis. Totally 180 clones by encoding nirS gene belong to 62 OTUs were obtained from three sampling stations. Three stations with different distribution patterns of OTUs revealed high diversity of denitrifying bacteria by encoding nirS gene. The similarity in the deduced amino acid sequence of all OTUs ranged from 50% to 100%. The numbers of OTUs from three stations ranged from 19 to 33. The phylogenetic analysis showed that 62 OTUs were divided into five groups, whose amino acid sequences were highly similar to those of denitrifying cultured or uncultured bacteria from sediments of ocean, estuary and mariculture, aquaculture wastewater and bay of eutrophication. The special community structure of denitrifying bacteria from sediments suggested the significant correlate with the fresh and salt water mixing and the nitrogen pollution in the Pear River Estuary. Canonical correspondence analysis also indicated that nitrogen nutrient and salinity were the major contributing parameter for the diversity and spatial distribution of denitrifying bacteria from sediments in the Pear River Estuary.

Key words Nitrite reductase (nirS) gene, Denitrifying bacteria, Diversity, Sediment, Pear River Estuary