

湛江湾沉积物中反硝化和厌氧氨氧化细菌的 丰度、多样性及分布特征*

毛铁墙¹ 董宏坡² 陈法锦¹ 侯庆华¹ 朱庆梅¹ 阳雯娜¹
张家伟¹ 纪梓晗¹ 凌炜琪¹

(1. 广东海洋大学 海洋与气象学院 湛江 524088; 2. 华东师范大学 河口海岸学国家重点实验室 上海 200062)

摘要 采用实时荧光定量 PCR、高通量测序等方法对湛江湾沉积物中四个月的反硝化细菌与厌氧氨氧化细菌的多样性和丰度进行了分析。结果表明: 湛江湾沉积物中反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌丰度在四个月份的变化和空间分布趋势为: nirS 型反硝化细菌在二月份最高, 四月份最低, 且其平均丰度有从湛江湾湾内向湾口附近呈现先升高再降低的趋势; nirK 型反硝化细菌丰度在九月份最高, 十一月份最低; nosZ 型反硝化细菌在四月份最高, 其余月份变化不大; 厌氧氨氧化细菌丰度在九月份最高, 二月份最低。通过相关性分析结果表明, 亚硝酸盐、铵盐等共同调控着湛江湾沉积物中反硝化和厌氧氨氧化细菌丰度变化。系统发育分析表明: 湛江湾中存在着一些广泛分布的反硝化细菌, 但也生活着一些新奇的 nirK 型和 nosZ 型反硝化细菌。对于厌氧氨氧化细菌而言, 其主要属于浮霉菌门及 *Candidatus Scalindua* 属, 具有较高的耐盐性, 另外湛江湾海区的厌氧氨氧化细菌也生活着一类在其他地方没有的新分支。典范对应分析分析结果表明: 硝酸盐显著影响湛江湾反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌的群落结构。湛江湾沉积物中反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌存在特殊的竞争与共存的关系, 且由亚硝酸盐、硝酸盐、pH 等多种环境因子共同驱动。

关键词 反硝化和厌氧氨氧化细菌; 实时荧光定量 PCR; 高通量测序; 多样性; 丰度; 湛江湾
中图分类号 X52 doi: 10.11693/hyhz20190600108

反硝化微生物在海洋中发挥着重要的作用, 其主要功能是将 NO_3^- (或 NO_2^-) 转变为气态产物(包括 NO 、 N_2O 、 N_2), 它们多属于异养或兼性厌氧菌(Senga *et al.*, 2010)。在反硝化过程中, NO_3^- (或 NO_2^-) 主要作为电子传递链的末端电子受体; 参与的酶包括硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶、一氧化氮还原酶以及氧化亚氮还原酶等。亚硝酸盐还原酶是反硝化过程的限速酶, 负责将 NO_2^- 还原为 NO ; 亚硝酸还原酶主要以两种结构不同但功能相同的形式存在: nirK(含铜型)、nirS(细胞色素 cd1 型)。目前, 亚硝酸盐还原酶作为分子标记已经广泛被用于研究反硝化细菌的种群结构

及多样性, 如 Dang 等(2009)对我国富营养化的胶州湾海域的 nirS 型反硝化细菌开展了较为深入的研究, 并首次发现沉积物的理化性质影响反硝化细菌的群落结构和分布。Mosier 等(2010)对旧金山海湾河口区的 nirS 和 nirK 型反硝化细菌的丰度、多样性以及潜在的反硝化速率进行了研究, 结果发现 nirS 型反硝化细菌丰度及群落多样性均高于 nirK 型, 反硝化速率与 nirS 型反硝化细菌丰度呈显著正相关, 表明 nirS 型较之 nirK 型反硝化细菌在该海域具有更重要的生物地球化学意义。Smith 等(2015)对美国 Monterey 海湾潮间带沉积物中的氨氧化和反硝化微生物的时空

* 国家自然科学基金, 41576123 号, 41971125 号; 广东省自然科学基金, 2018A030313164 号。毛铁墙, 硕士研究生, E-mail: 824302238@qq.com

通信作者: 董宏坡, 研究员, E-mail: donghongpo2001@hotmail.com; hpdong@sklec.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2019-06-11, 收修改稿日期: 2019-09-12

分布及潜在活性开展了研究, 结果表明反硝化细菌和氨氧化微生物之间存在相互关系或耦合作用。近些年来, 随着温室气体(如 N_2O)排放量逐渐增加, 使得科学家对于氧化亚氮还原酶基因(*nosZ*)也产生了浓厚的兴趣(Choi *et al.*, 2016)。

尽管反硝化作用一直被认为是海洋中脱氮的最重要过程, 但随着厌氧氨氧化(anammox)的发现并对其逐步的深入研究, 科学家普遍认为厌氧氨氧化才可能是海洋氮损失的主要原因(Thamdrup *et al.*, 2002)。有研究表明, 厌氧氨氧化细菌对海洋中 N_2 产生的贡献率约为 50% (Jetten *et al.*, 2009), 对淡水生态系统中 N_2 产生的贡献率约为 30% (Wenk *et al.*, 2013); 也有研究表明, 厌氧氨氧化在沉积物中脱氮贡献率最高可达 80% (Thamdrup, 2012)。厌氧氨氧化微生物为专性厌氧的化能自养型细菌, 其主要在厌氧环境下, 以 CO_2 为唯一碳源, 将氨氧化为氮气($NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2H_2O$)。16SrRNA 基因分析结果表明, 厌氧氨氧化细菌隶属于浮霉菌门(Strous *et al.*, 1999), 分为五个 *Candidatus* 属: “*Candidatus Kuenenia*”、“*Candidatus Brocadia*”、“*Candidatus Scalindua*”、“*Candidatus Anammoxoglobus*”和“*Candidatus Jettenia*”, 且在海洋生态系统中, *Candidatus Scalindua* 占主导地位(Choi *et al.*, 2016)。但由于培养条件的苛刻与困难, 至今厌氧氨氧化细菌暂无纯培养菌株(Dang *et al.*, 2010), 环境中厌氧氨氧化细菌的丰度和多样性主要通过特异性引物如 Anammox 16SrRNA 或 *hzo* 基因(Schmid *et al.*, 2008)进行研究。近些年来, 许多科学家使用分子生态学手段在海洋(Dang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2016)、淡水(Penton *et al.*, 2006)以及陆地生态系统(Wang *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2016)等生境中检测到了厌氧氨氧化细菌, 并对其丰度、多样性以及生理生态功能开展了较为深入的研究。

反硝化和厌氧氨氧化细菌可能会利用相同的底物(NO_2^- 或 NO_3^-), 这可能会影响反硝化作用的潜在速率(Kim *et al.*, 2016)。国内学者已经对莱州湾、胶州湾、渤海湾(Dang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013, 2014)等海湾的反硝化细菌或厌氧氨氧化细菌开展了深入的研究, 但对热带海湾中的反硝化细菌及厌氧氨氧化细菌, 以及它们之间的关系却研究甚少。近些年来, 地处亚热带季风气候的湛江湾经济发展迅猛, 无机氮浓度表现出一定增加的趋势(袁旗等, 2016)。在这样的一个地理环境、气候条件下, 反硝化细菌与厌氧氨氧化如何在

氮循环中发挥作用、以及它们之间的关系目前仍了解不深。本研究选取湛江湾沉积物作为研究对象, 通过分子生态学手段, 对湛江湾反硝化细菌、厌氧氨氧化细菌丰度及多样性进行分析, 探讨反硝化细菌、厌氧氨氧化细菌的丰度、多样性、群落结构与环境因子的关系, 以期为进一步认识反硝化微生物和厌氧氨氧化微生物之间的关系以及它们在氮循环中的作用提供理论依据, 并为热带海湾氮污染治理提供新线索。

1 材料与方法

1.1 样品采集

湛江湾(110.32°—110.52°E, 21.05°—21.38°N)位于中国粤西雷州半岛的东北侧, 临近南海, 其水域面积为 1419km², 平均水深约 13m, 湛江地区属于热带亚热带季风气候, 由于河流输入、潮汐作用、排污口等人为因素导致湛江湾沉积速率较快, 其营养盐在四季的分布不均可能对沉积物中的微生物活动有着重要的影响。2017年4月、9月、11月, 2018年2月份航次采集湛江湾 15 个站位表层(0—3cm)沉积物样品, 站位信息详见图 1。沉积物泥样使用抓斗采泥器采集, 取少量表层沉积物样品装入已灭菌的采样杯, -20°C 低温保存并带回实验室。取少量沉积物进行分装、离心, 并于-80°C 冰箱保存, 以用于 DNA 提取; 另取部分样品进行理化参数分析。

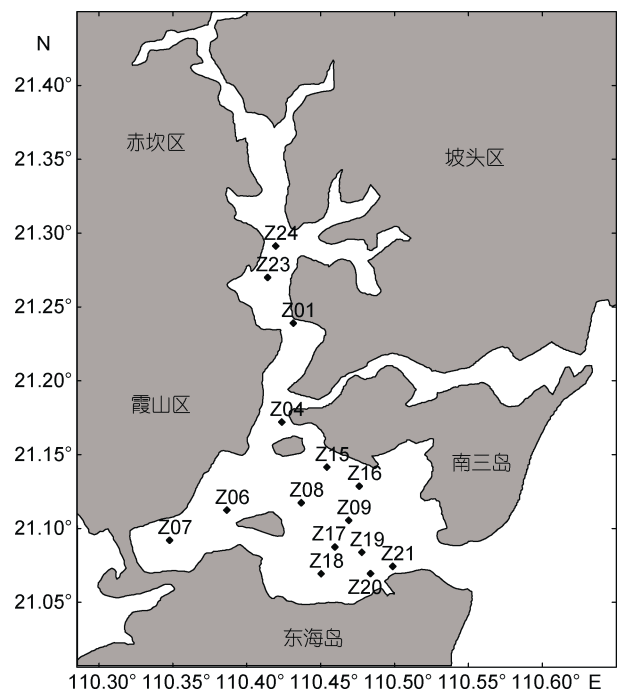


图 1 湛江湾沉积物采样站位

Fig.1 The sampling sites in Zhanjiang Bay

1.2 沉积物及其上覆水的理化指标测定

营养盐、总有机碳(TOC)以及沉积物含水率的测定均参照《土壤农化分析》(鲍士旦, 2008)的方法, 用 2mol/L KCl 溶液浸提取沉积物样品, 浸提液经聚醚砜针式滤头(13mm, 0.45 μ m, 安普, 上海)过滤后, 采用连续流动分析仪(Skalar Analytical B.V SAN⁺⁺, 检测限: 0.1 μ mol/L)测定 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、NO₂⁻-N, TOC 含量用重铬酸钾-氧化还原滴定法进行测定。通过 Wang 等(2014)的方法, 使用采水器采集沉积物上覆水, 并采用碘量滴定法测定溶解氧(DO)。沉积物中的 pH 使用 pH 计(雷磁, 上海仪电科学)进行测定; 使用温度计(雷磁, 上海仪电科学)测定温度; 对于孔隙水的获取, 取适量沉积物至 2mL 离心管, 12000r/min 室温离心, 然后使用盐度计(WYY- 盐度计, 深圳)测量盐度。

1.3 DNA 提取与实时荧光定量 PCR

DNA 提取使用 PowerSoil[®]DNA Isolation Kit 提取试剂盒(MoBio 公司, 加拿大)从沉积物样品中提取总 DNA, 并通过 NanoVue[™] Plus 微量分析仪(GE 公司, 英国)测定其 DNA 浓度。使用实时荧光定量 PCR 检测系统(CFX96 Touch[™], Bio-Rad 公司, 美国)进行定量 PCR, 定量 PCR 选择的特异性引物如表 1 所示。对于细胞色素 cd1-亚硝酸盐还原酶(nirS)基因、Cu-亚硝酸盐还原酶(nirK)基因、一氧化二氮还原酶(nosZ)基因以及厌氧氨氧化的 Ca.scalindua16SrRNA 基因, 总反应

体系为 20 μ L, 包括 SYBR Permixon ExTaq^M II (2 \times) (Takara, 大连) 10 μ L, 正、反向引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), 1 μ L 模板 DNA, 用双蒸馏水(ddH₂O)补至 20 μ L。各基因扩增程序如下: 95 $^{\circ}$ C, 30s; 95 $^{\circ}$ C, 5s; 退火温度见表 1, 退火时间: 30s; 72 $^{\circ}$ C, 30s (nirS、Ca.scalindua16SrRNA 基因延伸时间为 60s); 共 40 个循环, 添加溶解曲线(将温度从 65 $^{\circ}$ C 提高至 95 $^{\circ}$ C, 每 5s 提高 0.5 $^{\circ}$ C)。所有的 DNA 样品及标准质粒都设置三个平行。

本研究设置阴性对照, 对标准质粒进行 10 倍梯度稀释, 再进行 qPCR, 并绘制标准曲线。质粒标准品的构建主要按以下流程进行: 使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(Axygen, 美国)分别获得纯化后的 nirS、nirK、nosZ、Ca.scalindua16SrRNA 基因片段 PCR 产物, 利用 pMD[®] 18-T Vector 连接试剂盒(Takara, 大连)将目的片段连接到载体上, 并将重组质粒导入大肠杆菌感受态细胞, 再涂布至含有 AMP 的固体培养基, 放入恒温震荡培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养 12h; 然后挑取已做好标记的 1/2 单菌落进行菌落 PCR, 验证完毕后, 选取扩增结果良好的单菌落转入含有适宜浓度 AMP 的液体培养基, 并将其放至恒温震荡培养箱(37 $^{\circ}$ C、180r/min)培养 12—16h; 然后使用质粒提取试剂盒(Takara, 大连)提取质粒, 从而获得质粒标准品。扩增效率由以下公式计算: $E\% = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$ (式中 slope: 标曲斜率) (Klein, 2002), 本研究的斜率在 -3.79—-3.05, 其扩增效率在 84%—112%之间($R^2 > 0.98$)。

表 1 定量 PCR(qPCR)引物
Tab.1 Quantitative PCR (qPCR) primers used in this study

目的基因	引物序列(5'—3')	退火($^{\circ}$ C)	扩增效率(%)	参考文献
nirS	cd3aF: GTS AAC GTS AAG GARACS GG R3cd: GAS TTC GGR TGS GTC TTG A	57	95—110	(Throbäck <i>et al.</i> , 2004)
nirK	nirK876F: ATYGGCCGGVAYGGCGA nirK1040R: GCCTCGATCAGRTRTGGTT	56	90—112	(Henry <i>et al.</i> , 2004)
nosZ	nosZ1F: WCSYTGTTTCMTCGACAGCCAG nosZ1R: ATGTCGATCARCTGVKCRITYTC	56	86—90	(Henry <i>et al.</i> , 2006)
Ca.scalindua 16SrRNA	Brod541F: GAGCACGTAGGTGGGTTTGT Brod1260R: GGATTCGCTTCACTCTCGG	60	84—92	(Penton <i>et al.</i> , 2006)

1.4 文库构建与高通量测序

以沉积物基因组 DNA 作为 PCR 模板, 使用表 1 中 nirS、nirK、nosZ 特异性引物, 利用 Veriti[™] 96-Well 热循环仪(Applied Biosystems, Foster, CA, 美国)进行 PCR 扩增, 由于高通量测序结果需要对不同样品序列进行区分, 故本研究对引物上游 5'端添加标签(Barcode)。PCR 扩增体系(20 μ L)为: 10 μ L 2 \times Taq Plus Master mix

(南京诺唯赞生物科技有限公司), 1 μ L 模板 DNA, 正、反向引物各 0.5 μ L (15 μ mol/L), 8 μ L ddH₂O。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 退火: (nirS、nirK、nosZ、Ca.scalindua16SrRNA 基因的退火温度和时间分别为: 56 $^{\circ}$ C、20s; 58 $^{\circ}$ C、30s; 57 $^{\circ}$ C、30s; 57 $^{\circ}$ C、1min), 72 $^{\circ}$ C 延伸 45s, 循环数为 35 个; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 1.2%琼脂

糖凝胶电泳进行检测,用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(Axygen, 美国)进行回收纯化,送至上海微生物科技有限公司对 PCR 产物进行定量和均一化,构建 PE 文库,并在 Illumina 平台进行高通量测序。基于 MOTHUR v.1.39.5 软件平台,按照 MOTHUR 操作流程(https://mothur.org/wiki/MiSeq_SOP),对获得的序列进行处理优化,并按照 97%的相似度进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)划分,用于 Coverage、Chao1、Shannon、Simpson 等多样性指数分析(Wang *et al.*, 2014)。

1.5 系统发育分析

抽取 reads 数为前 20 的 OTU 的代表序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST,提取其相似度高的前几条序列与已知的 OTU 代表序列导入 MEGA7.0 软件,使用邻接法(neighbor-joining)对系统软件进行发育分析,构建系统发生树(phylogenetic tree),自助法(Bootstrap method)设置 1000 次计算,步长值(bootstrap value)低于 50%不予以显示。

1.6 生物学统计分析

使用 SPSS 22 软件分析反硝化细菌、厌氧氨氧化

细菌丰度与环境因子之间的相关性和显著性水平($P < 0.05$ 即有显著相关性),单因素方差分析,以及线性回归分析。用 Vegan 软件中的典范对应分析(canonical correspondence analysis, CCA)解析各站位的反硝化细菌、厌氧氨氧化细菌群落结构与环境因子之间的关系。用蒙特卡罗置换检验(Monte Carlo Permutation Test)检验环境因子和群落结构之间相关显著性。

2 结果与分析

2.1 沉积物样品的理化性质

沉积物样品的理化性质各月份变化趋势如表 2 所示。溶解氧在四月份都整体较高,最高可达 8.49mg/L,可能对厌氧微生物的活动有一定的抑制作用;pH 值显示湛江湾沉积物在十一月份时偏弱酸性(6.26),而四月份时偏弱碱性(7.99);盐度在九月份时最低(25.60),在二月份时最高(29.42);铵盐浓度在十一月份最低(3.42mg/kg),在九月份最高(7.39mg/kg);硝酸盐浓度在九月份最低(0.06mg/kg),四月份最高(0.40mg/kg);亚硝酸盐在十一月份最高(0.52mg/kg),而在四月、九月份未检测到。

表 2 不同月份沉积物理化参数

Tab.2 Characteristics of sediment samples in different months

环境参数	二月份	四月份	九月份	十一月份
温度(°C)	19.05±0.54	24.27±0.17	30.64±0.53	21.35±1.27
溶解氧(mg/L)	8.49±0.26	7.10±0.98	5.57±0.84	7.38±0.44
pH	6.72±0.74	7.99±0.03	7.84±0.09	6.26±0.16
盐度	29.42±1.31	27.10 ±2.26	25.60±2.24	28.51±1.10
TOC (%)	0.99±0.46	1.12±0.44	1.01±0.43	0.59±0.43
NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	3.98±2.51	4.09±3.27	7.39±4.98	3.42±3.16
NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	0.10±0.08	0.39±0.17	0.06±0.02	0.24±0.12
NO ₂ ⁻ -N (mg/kg)	0.47±0.05	n.d.	n.d.	0.52±0.15

注:n.d.: 未检测到; TOC: 总有机碳; NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、NO₂⁻-N 浓度均为提取态含量; 溶解氧为底层水的含量

2.2 反硝化细菌及厌氧氨氧化细菌丰度与环境影响因素

通过实时荧光定量 PCR,对湛江湾各站位沉积物样品进行了基于 DNA 水平上的绝对定量,结果显示: nirS 型、nirK 型、nosZ 型反硝化细菌、厌氧氨氧化细菌在四月份的丰度平均值变化范围分别为: 6.17×10⁵—9.12×10⁵copies/g (以干土计), 8.00×10⁴—6.72×10⁵copies/g (以干土计), 6.39×10³—1.81×10⁴copies/g (以干土计), 2.85×10⁴—8.13×10⁵copies/g (以干土计)。在湛江湾四月份中发现: nirS 型反硝化细菌丰度在

二月份达到最高(ANOVA, $F=8.60$, $P=0.012$),各站位平均丰度为 9.12×10⁵copies/g (以干土计),在四月份、九月份、十一月份的平均丰度分别为 6.17×10⁵copies/g (以干土计)、7.59×10⁵copies/g (以干土计)、8.20×10⁵copies/g (以干土计)。nirS 型反硝化细菌四月份平均丰度在位于特呈岛旁的 Z15 站位较之其它站位高一个数量级,而位于宝钢排污口的 Z21 站位平均丰度低于其他站位,仅为 4.61×10⁵copies/g (以干土计),各站位在四月份的平均丰度有从湛江湾湾内向湾口附近呈现先升高再降低的趋势。nirK 型反硝化细菌

在九月份丰度最高(ANOVA, $F=5.43$, $P=0.043$), 平均丰度为 6.72×10^5 copies/g (以干土计); 四月份次之, 其平均丰度为 2.14×10^5 copies/g (以干土计); 十一月份最低(ANOVA, $F=5.21$, $P=0.045$), 其平均丰度为 3.88×10^4 copies/g (以干土计)。nosZ 型反硝化细菌在四月份有最高丰度(ANOVA, $F=24.79$, $P=0.000$), 其平均丰度为 1.81×10^4 copies/g (以干土计), 而在其他三个月份的丰度变化不大, 其空间分布的趋势与 nirS 型反硝化细菌大体一致。对于厌氧氨氧化细菌而言, 其在九月份有最高丰度(ANOVA, $F=4.65$, $P=0.049$), 平均丰度为 8.13×10^5 copies/g (以干土计); 四月份次之, 平均丰度为 1.74×10^5 copies/g (以干土计); 二月份丰度最低(ANOVA, $F=7.19$, $P=0.018$),

平均丰度为 2.85×10^4 copies/g (以干土计)。厌氧氨氧化细菌四个月的平均丰度在位于火电厂旁的 Z24 站位平均丰度较之其他站位低了一个数量级, 而 Z18 站位平均丰度最高, 为 8.22×10^5 copies/g (以干土计)。总的说来, 在四个月份中 nirS 型反硝化细菌平均丰度最高, nosZ 型反硝化细菌丰度在反硝化细菌中占比最低; 而厌氧氨氧化细菌与在湛江湾中占主导作用的 nirS 型反硝化细菌相比较, 两者在四、九月份丰度相差不大, 均处于同一数量级, 而在二月份、十一月份厌氧氨氧化细菌丰度则均低于 nirS 型反硝化细菌。另外, 四个月的 nirS 型反硝化细菌丰度与厌氧氨氧化细菌丰度呈显著正相关性($R=0.572$, $P < 0.05$)。

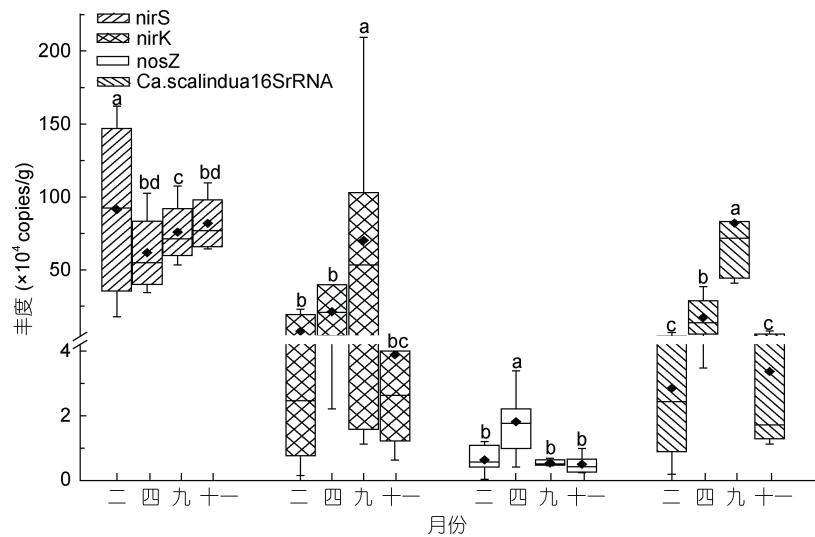


图2 不同月份沉积物中反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌丰度变化箱型图

Fig.2 Box plot of abundance changes of denitrifying bacteria and anaerobic ammonium oxidizing bacteria in sediments of different months

注: 箱型图从下往上的横线依次是下边缘、四分之一分位数、中位数、四分之三分位数、上边缘, 图中“ ”表示平均值, 二、四、九、十一分别表示二月份、四月份、九月份、十一月份。a、b、c、d表示各基因季节间的差异。

使用 SPSS 22 分别对 nirS、nirK、nosZ 型反硝化细菌、厌氧氨氧化细菌丰度与沉积物样品中的环境因子进行相关性分析(表 3)。结果表明, nirS 型反硝化细菌丰度与 NO_2^- -N 呈显著正相关($P < 0.05$), 与 pH 呈显著负相关($P < 0.05$); nirK 型反硝化细菌丰度与盐度呈显著负相关($P < 0.05$); nosZ 型反硝化细菌丰度与 NO_3^- -N、pH 呈显著性正相关($P < 0.05$), 与温度呈显著负相关($P < 0.05$); 厌氧氨氧化细菌丰度与 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 呈显著正相关($P < 0.05$)。

2.3 湛江湾沉积物中反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌的多样性

表 4 展现了 5 个沉积物站位中反硝化细菌和厌氧

氨氧化细菌的 OTU 数目和多样性指数。从所有站位丰富度与多样性指数计算结果来看, 反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌文库覆盖率均在 99%以上, 表明得到的多样性指数数据有效可靠。

对于反硝化细菌, 其在所有样品中的 OTU 数范围为 278—563, nosZ 的 OTU 数最大, nirK 的 OTU 数最小; 通过 Chao1 指数评估样品中群落丰富度可知, nirS、nosZ 型反硝化细菌均在 Z15 站位丰富度最高, Z24 站位最小。nirK 型反硝化细菌在 Z21 站位丰富度最高, Z06 站位最小。通过 Shannon 指数和 Simpson 指数对群落多样性进行分析, 结果表明, 对于 nirS 型反硝化细菌, 其群落多样性在的 Z15 站位最大, 在 Z21

表 3 反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌丰度与环境变量的相关性分析
Tab.3 Correlation between abundances of denitrifying bacteria or anammox bacteria, and environmental variables

	nirS	nirK	nosZ	Ca.scalindua-16SrRNA	nirS/Ca.scalindua-16SrRNA
NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	0.476	0.287	-0.064	0.959**	-0.070
NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	-0.667	0.511	0.172	0.028	-0.070
NO ₂ ⁻ -N (mg/kg)	0.961*	-0.343	0.578**	0.484*	-0.570*
TOC (%)	0.357	-0.348	0.082	0.109	0.054
盐度	0.180	-0.855*	0.230	-0.115	0.324
温度 (°C)	-0.048	-0.142	-0.407*	0.245	-0.140
溶解氧(mg/L)	-0.048	0.236	0.449*	0.245	0.201
pH	-0.503*	-0.066	0.159	0.142	-0.229

注: **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$; TOC: 总有机碳

表 4 nirS、nirK、nosZ、Ca.scalindua16SrRNA 基因的丰富度和多样性
Tab.4 Richness and diversity of nirS, nirK, nosZ, Ca.scalindua16SrRNA genes

站 位	OTU 数	覆盖率(%)	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
	nirS/ nirK/ nosZ/ Ca.scalindua- 16SrRNA	nirS/ nirK/ nosZ/ Ca.scalindua- 16SrRNA	nirS/ nirK/ nosZ/ Ca.scalindua- 16SrRNA	nirS/ nirK/ nosZ/ Ca.scalindua- 16SrRNA	nirS/ nirK/ nosZ/ Ca.scalindua- 16SrRNA
Z06	378.00/ 217.00/ 421.00/ 35.00	99.89/ 99.90/ 99.97/ 99.97	396.37/ 244.14/ 427.11/ 56.00	4.23/ 3.96/ 5.15/ 1.92	0.053/ 0.053/ 0.0097/ 0.19
Z15	448.00/ 350.00/ 563.00/ 44.00	99.92/ 99.24/ 99.95/ 99.99	459.05/ 417.10/ 569.95/ 46.50	4.86/ 4.49/ 5.37/ 1.65	0.020/ 0.030/ 0.0095/ 0.27
Z17	415.00/ 411.00/ 512.00/ 44.00	99.92/ 99.90/ 99.92/ 99.97	433.00/ 435.17/ 527.79/ 51.20	4.49/ 4.94/ 5.09/ 1.54	0.026/ 0.016/ 0.014/ 0.33
Z21	367.00/ 432.00/ 491.00/ 48.00	99.83/ 99.88/ 99.92/ 99.98	404.94/ 449.25/ 508.10/ 50.50	3.91/ 5.09/ 4.97/ 2.06	0.068/ 0.016/ 0.015/ 0.20
Z24	343.00/ 278.00/ 400.00/ 36.00	99.95/ 99.95/ 99.97/ 99.97	351.08/ 291.13/ 405.50/ 45.00	4.65/ 4.12/ 4.99/ 0.62	0.024/ 0.050/ 0.013/ 0.78

站位最小; nirK 型反硝化细菌的群落多样性在 Z21 站位最大, 在 Z06 站位最小; nosZ 型反硝化菌的群落多样性在 Z15 站位最大, 在 Z21 站位最小。

对于厌氧氨氧化细菌而言, 在所有站位的样品中, Ca.scalindua16SrRNA 共有 207 个 OTUs, 通过 Chao1 指数评估样品中群落丰富度, 其在 Z06 站位最大, 在 Z24 站位最小; 通过 Shannon 指数和 Simpson 指数对群落多样性进行分析, 其群落多样性在湾口附近的 Z21 站位最大, 在 Z24 站位最小。

总而言之, 在湛江湾中, 反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌在不同环境下的群落组成不同, 且反硝化细菌的生物多样性明显比厌氧氨氧化细菌高。

2.4 湛江湾沉积物中反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌系统发育分析

基于 OTU 聚类结果, 提取 reads 数值为前 20 的 OTU 为代表序列, 在 NCBI 数据库中进行 BLAST, 提取同源性高的序列导入 MEGA7.0 中, 基于核酸序列

进行系统发育分析, 构建系统进化树, 如图 3—6。nirS、nirK、nosZ、Ca.scalindua16SrRNA 的 OTUs 分别占总序列的 50.05%、44.24%、29.40%、98.45%。

对于 nirS 基因, 系统进化树可划分为 6 个 Cluster, Cluster 有 10 个 OTUs 跟不同环境得到的序列存在亲缘关系, 包括来自河口、水产养殖区、富营养化的海湾的沉积物。Cluster 中 OTU14 和 OTU17 与九龙江和闽江、珠江口富营养化的河口沉积物中得到的序列有着很高的亲缘关系。Cluster 中 OTU34、OTU13 与来自河口、海岸湿地沉积物得到的序列有很大的相似性。Cluster 中有 3 个 nirS OTUs 与富营养化的长江口、大陆边缘沉积物得到的序列有高亲缘关系。Cluster 中 OTU5、OTU12 与海洋表层、河口、富营养化河口区、海湾沉积物存在一定得亲缘关系。Cluster 中只有 OTU10 与 Chesapeake 海湾的水层、河口等地区的沉积物有一定亲缘关系。总的说来, 与 nirS 基因 OTUs 同源性高的序列大部分来自河口沉积物。

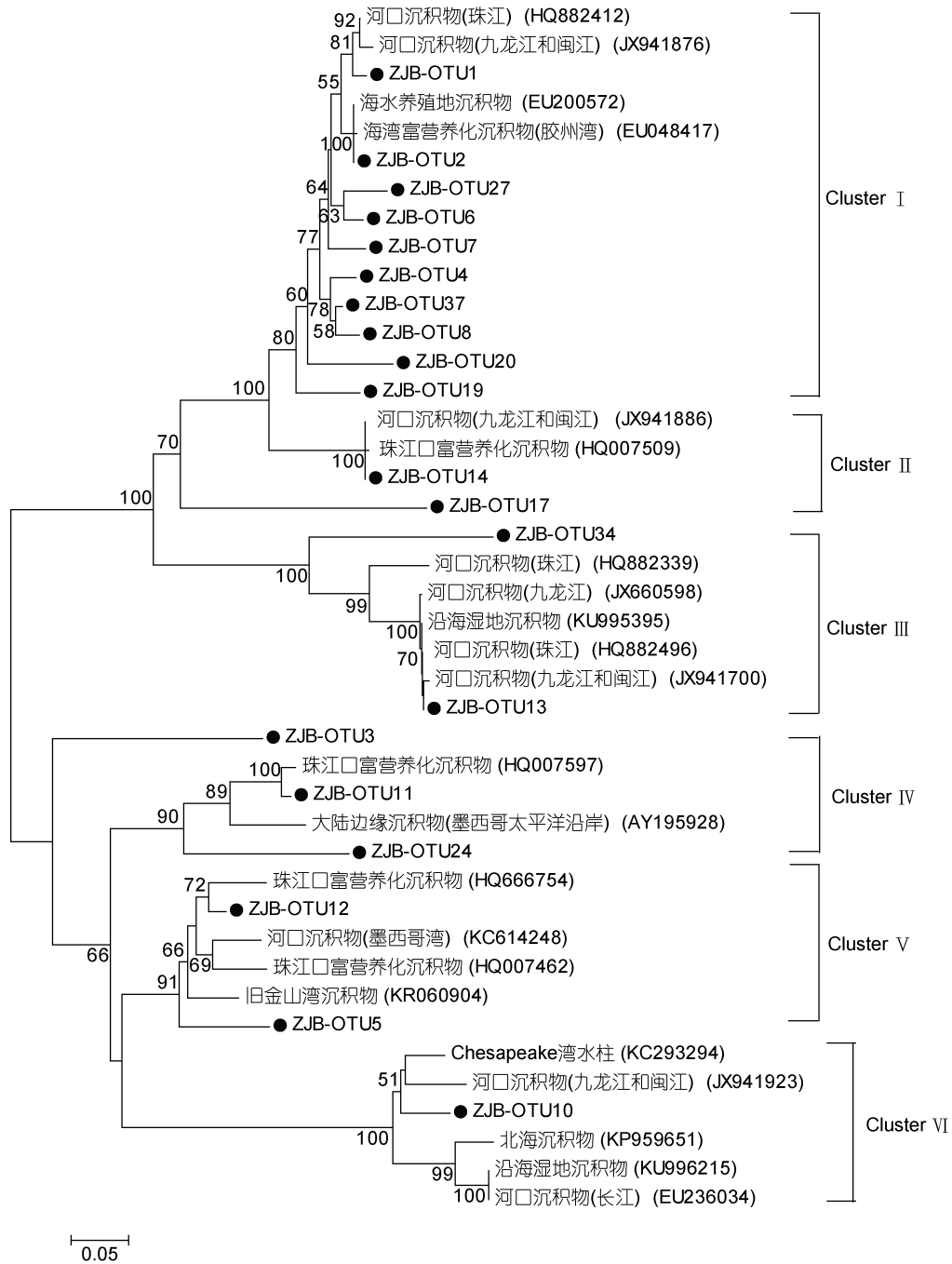


图3 基于反硝化细菌 nirS 序列构建的 NJ 系统进化树(自展 1000 次验证节点置信度)

Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree based on denitrifying bacteria nirS sequence (Bootstrap values were calculated using 1000 replications)

注: 在分支点处只显示超过 50%的自举值, 本研究的序列用黑色实心圆圈表示, 比例尺表示核苷酸取代百分比。

对于 nirK 基因, 共可分为五个 Cluster, Cluster 包含 8 个 OTUs, 它们与不同环境下获得的序列有着一定的亲缘关系, 如黄河河口、我国东部海域、美国加利福尼亚海湾等的沉积物。Cluster 只包含 OTU12, 它与黄河河口沉积物、Fenghua 垃圾填埋场、湿地土壤获得的序列有着较高同源性。Cluster 包含三个

OTUs, 分别为 OTU18、OTU6、OTU10, 它们间的相似性为 96%—97%, 与加利福尼亚河口沉积物中所获得的序列有着一定的相似性(84%—87%)。Cluster 也只包含三个 OTUs, 分别为 OTU13、OTU3、OTU7, 它们与加利福尼亚河口区沉积物获得的序列有一定的同源性(85%)。Cluster 包含 4 个 OTUs, 它们与湿

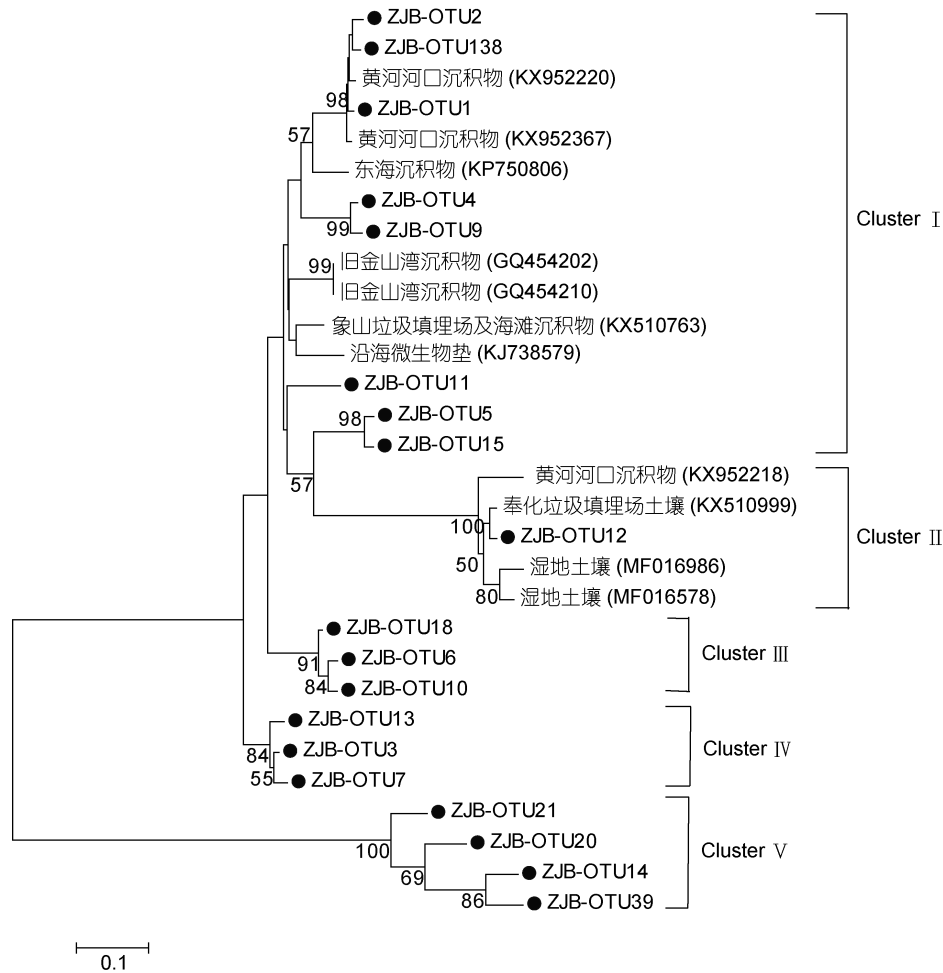


图4 基于反硝化细菌 *nirK* 序列构建的 NJ 系统进化树(自展 1000 次验证节点置信度)

Fig.4 Neighbor-joining phylogenetic tree based on denitrifying bacteria *nirK* sequence
(Bootstrap values were calculated using 1000 replications)

注: 在分支点处只显示超过 50% 的自举值, 本研究的序列用黑色实心圆圈表示, 比例尺表示核苷酸取代百分比。

地土壤获得的序列有着很高的相似性(96%—100%)。

对于 *nosZ* 基因, 其系统进化树可分为 4 个 Cluster。Cluster I 中共计 14 个 OTUs, 其中 OTU8、OTU101、OTU24、OTU10、OTU26 都属于 *Alpha-proteobacteria*, 其他 9 个 OTUs 与来自不同环境里得到的序列有一定的亲缘关系, 包括海洋沉积物、红树林湿地土壤、近海岸沉积物等。Cluster II 包含 3 个 OTUs, 它们与近海岸、深海沉积物, 近海岸海水得到的序列存在一定的同源性。Cluster III 中包含 2 个 OTUs, 分别为 OTU2、OTU41, 它们只与从莱州湾沉积物中得到的序列有高亲缘关系。Cluster IV 只有 OTU7 与从湿地、草原土壤, 及鄱阳湖沉积物中得到的序列有一定同源性。

对于 *Ca.scalindua16SrRNA* 基因而言, 其系统进化树可分为 3 个 Cluster。Cluster I 共包含 7 个 OTUs,

它们归属于未可培养的 *Candidatus Scalindua* sp. 其相似性范围为 94%—97%, 同时它们与不同环境下得到的序列存在一定同源性关系, 如深海冷泉、胶州湾、淡水湖等区域的沉积物。Cluster II 包含 6 个 OTUs, 它们与从淡水、水产养殖区、盐湖的沉积物中得到的序列有较高亲缘关系。Cluster III 包括 7 个 OTUs, OTU10、OTU11、OTU13、OTU15 均未在 NCBI 数据库里找到与之相匹配的序列, 本研究将其定义为一个 new cluster。

2.5 反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌的群落结构与环境因子之间的关系分析

通过 CCA 分析环境变化对反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌群落结构的影响(图 7)。从图 7a 可以看出, 两个 CCA 轴解释了 96.34% 的 *nirS* 型反硝化细菌群落结构的变化, 且 TOC 对 *nirS* 型反硝化细菌群落结构

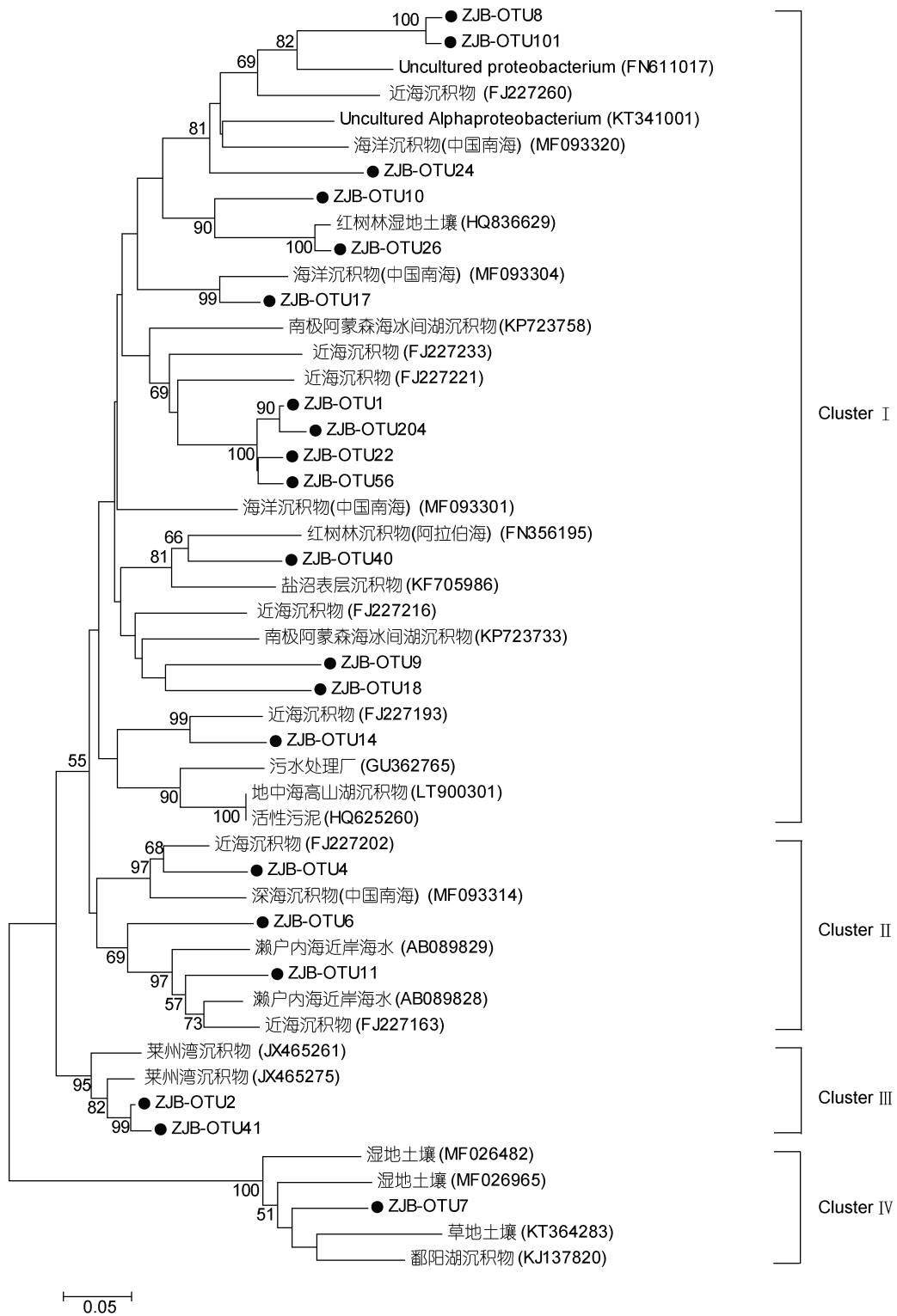


图 5 基于反硝化细菌 *nosZ* 序列构建的 NJ 系统进化树(自展 1000 次验证节点置信度)

Fig.5 Neighbor-joining phylogenetic tree based on denitrifying bacteria *nosZ* sequence (Bootstrap values were calculated using 1000 replications)

注: 在分支点处只显示超过 50%的自举值, 本研究的序列用黑色实心圆圈表示, 比例尺表示核苷酸取代百分比。

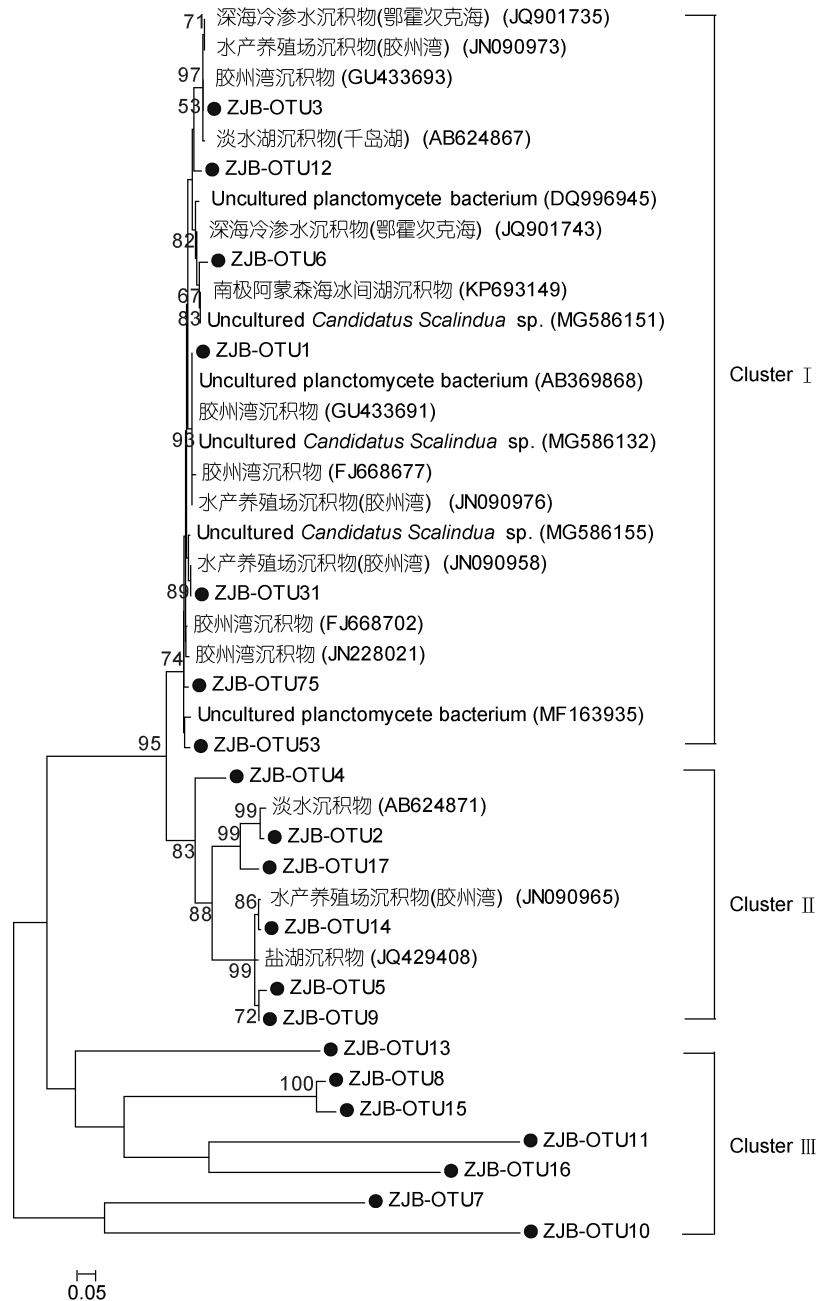


图 6 基于厌氧氨氧化细菌 *Ca. scalindua* 16SrRNA 序列构建的 NJ 系统进化树(自展 1000 次验证节点置信度)

Fig.6 Neighbor-joining phylogenetic tree based on anammox bacteria *Ca. scalindua* 16SrRNA sequence (Bootstrap values were calculated using 1000 replications)

注: 在分支点处只显示超过 50% 的自举值, 本研究的序列用黑色实心圆圈表示, 比例尺表示核苷酸取代百分比。

的影响最大。溶解氧对 Z06、Z21 的 nirS 型反硝化细菌群落结构有较强的影响, 硝酸盐主要影响内湾的 Z24 站位的 nirS 型反硝化细菌群落结构。通过使用 Permutation 检验的五个环境因子, 结果表明, 硝酸盐 ($P < 0.05$) 与 nirS 型反硝化细菌的群落结构显著正相关。湾口 Z17、Z15 两站位的 nirS 型反硝化细菌群落结构相似度较高, 而内湾的 Z24 与其余几个站位的

nirS 型反硝化细菌群落结构存在较大差异。从图 7b 可以看出, 两个 CCA 轴解释了 89% 的 nirK 型反硝化细菌群落结构的变化, 且盐度对其影响最大。pH 对 Z17 的 nirK 型反硝化细菌群落结构影响较强, 溶解氧对 Z06 影响较强, 铵盐对 Z24 影响较强, 而盐度主要对 Z21、Z15 影响较强。通过使用 Permutation 检验五个环境因子, 结果表明硝酸盐 ($P < 0.05$) 与 nirK 型反硝

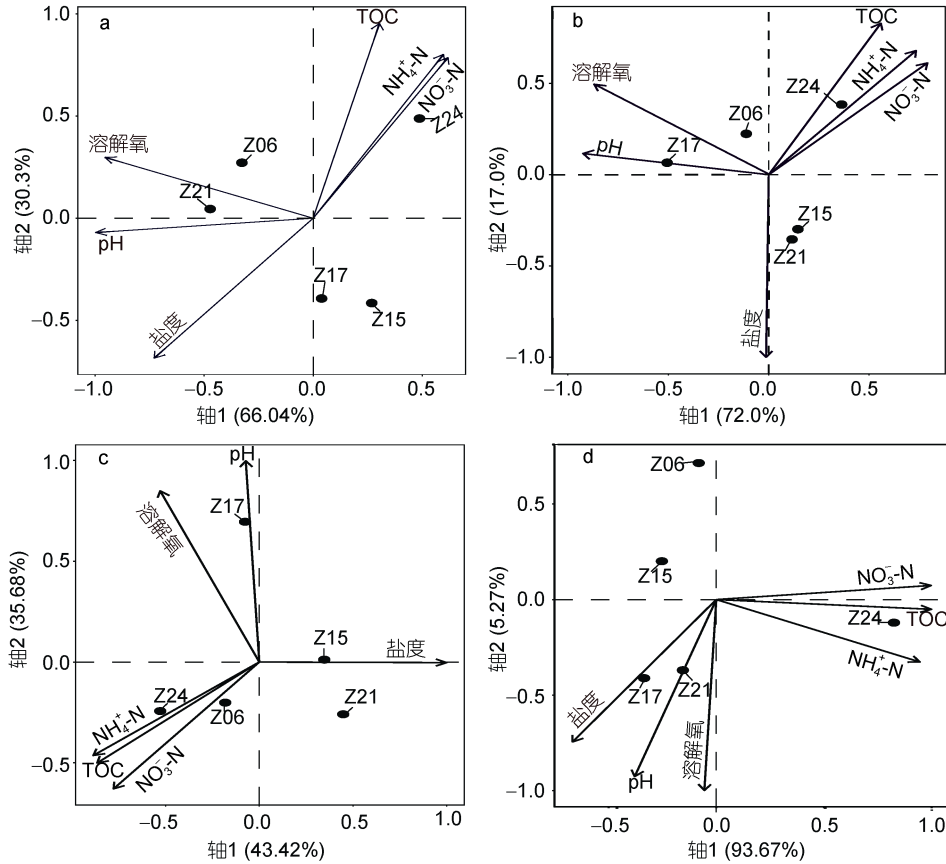


图 7 反硝化细菌、厌氧氨氧化细菌与环境因子的 CCA 分析

Fig.7 CCA ordination plots for relationships between denitrifier or anammox bacteria and environment factors
注: a: nirS 型反硝化细菌; b: nirK 型反硝化细菌; c: nosZ 型反硝化细菌; d: 厌氧氨氧化细菌

化细菌的群落结构显著正相关。Z21 和 Z15 站位的 nirK 型反硝化细菌存在着较高的群落结构相似性。从图 7C 可以看出, 两个 CCA 轴解释了 79.10% 的 nosZ 型反硝化细菌群落结构的变化, 且盐度对其影响最小。pH 对 Z17 的 nosZ 型反硝化细菌群落结构影响较强, 铵盐对 Z24 影响较强, 硝酸盐对 Z06 影响较强, 而盐度对 Z15 影响最强。使用 Permutation 检验五个环境因子, 结果表明, 各环境因子对 nosZ 型反硝化细菌群落结构均无显著性差异。在 Z06 和 Z24 的 nosZ 型反硝化细菌的群落结构具有较高相似性。从图 7D 可以看出, 两个 CCA 轴解释了 98.94% 的厌氧氨氧化细菌群落结构的变化, 且在 Z17 和 Z21 具有较高的群落相似性。溶解氧对厌氧氨氧化细菌群落结构影响较其他因素强。pH 对 Z21 站位的厌氧氨氧化细菌群落结构影响较强, 盐度对 Z17 影响较强, TOC 对 Z24 影响较强。通过使用 Permutation 检验, 结果表明铵盐 ($P < 0.05$) 和硝酸盐 ($P < 0.05$) 与厌氧氨细菌的群落结构具有显著正相关性。综上所述, 硝酸盐可能是影响反

硝化细菌和厌氧氨氧化细菌的一个重要环境因素。

3 讨论

尽管科学家们对于反硝化微生物和厌氧氨氧化微生物的丰度、多样性、群落结构等都有较为深入的研究 (Kim *et al*, 2016; Oshiki *et al*, 2016), 但对于反硝化细菌与厌氧氨氧化细菌之间的关系及其季节性的变化仍有一定的局限性。本研究对湛江湾沉积物中反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌各季度的丰度进行分析, 由图 2 可看出, 反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌在不同季节的丰度变化较大, 其整体丰度大小为: 秋季 > 夏季 > 春季 > 冬季, 这可能是由于湛江湾在一年中氮输入量在秋季最大, 夏季次之 (施玉珍等, 2015), 而亚硝酸盐、铵盐可分别为反硝化细菌和厌氧氨氧化微生物提供底物, 从而刺激反硝化作用及厌氧氨氧化作用, 本研究也发现 nirS、nosZ 型反硝化细菌丰度与亚硝酸盐均呈显著正相关性 ($P < 0.05$), 厌氧氨氧化细菌与铵盐、亚硝酸盐均呈现出显著的正相关性 ($P < 0.05$), 这可从一

定程度上说明亚硝酸盐和铵盐对反硝化作用及厌氧氨氧化作用的影响。对于反硝化细菌,其结果表明,湛江湾中的 nirS 型反硝化细菌丰度变化范围相对较低于旧金山海湾、莱州湾、扬子江河口区域(Mosier *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2015), 而比黄河河口区域高,其变化范围为 4.34×10^4 — 2.62×10^5 copies/g (以干土计)(Li *et al.*, 2017)。nirS 型反硝化细菌丰度在二月份最高,十一月份次之,四月份最低,这可能与 pH 和亚硝酸盐有关,pH 在四月份、九月份明显高于二月份和十一月份(表 2),而亚硝酸盐浓度则与之相反(四、九月份亚硝酸盐浓度低于检测限),尽管二月份的 pH 要高于十一月份,但二月份的亚硝酸盐浓度却低于十一月份;而从其空间分布来看,nirS 型反硝化细菌四个月份平均丰度在位于特呈岛旁的 Z15 站位较之其它站位高一个数量级,而位于宝钢排污口的 Z21 站位平均丰度低于其它站位,仅为 4.61×10^5 copies/g (以干土计),各站位在四个月份的平均丰度有从湛江湾湾内向湾口附近呈现先升高再降低的趋势,亚硝酸盐浓度也大致呈现出此变化趋势,且本研究发现 pH 与 nirS 型反硝化细菌丰度呈显著负相关($P < 0.05$),亚硝酸盐与其呈显著正相关($P < 0.05$),故而 pH 和亚硝酸盐可能相互制约、共同调控着湛江湾中的 nirS 型反硝化细菌丰度。nirK 型反硝化细菌丰度变化范围相对较一些河口区域低,如南海、旧金山海湾(Li *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2017),与美国 Elkhorn Slough 区域的 nirK 丰度大致相同(Smith *et al.*, 2015)。nirK 型反硝化细菌丰度在湛江湾四个月份的变化比较明显,在九月份的时候丰度最高,这可能是 DO 对其影响比较大(Lefebvre *et al.*, 2006)。nosZ 丰度变化范围相对来说比 La Caldera 湖低(Castellano-Hinojosa *et al.*, 2017),其在四月份丰度最大,其他月份相差不大明显,这可能与亚硝酸盐、温度、溶解氧有关(表 3)。从图 2 可看出湛江湾反硝化作用以 nirS 型反硝化细菌为主导,其丰度明显高于 nirK、nosZ 型反硝化细菌,这与在旧金山海湾的研究结果一致(Mosier *et al.*, 2010)。对于厌氧氨氧化细菌而言,其在九月份丰度最高,四月份次之,二月份最低,这可能与铵盐、亚硝酸盐有关。在湛江湾沉积物中,厌氧氨氧化细菌与主导反硝化作用的 nirS 型反硝化菌相比较,发现在二月份、十一月份时,厌氧氨氧化细菌丰度明显小于 nirS 型反硝化细菌,本研究通过 SPSS 22 分析丰度与环境因子的相关性时发现,厌氧氨氧化细菌丰度与 $\text{NO}_4^+ - \text{N}$ 呈显著

的正相关性($P < 0.05$),且二月份、十一月份的 $\text{NO}_4^+ - \text{N}$ 浓度低于四、九月份,这可从一定程度上说明厌氧氨氧化微生物在此时的活动受到一定的抑制,使得 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 消耗量减少,其浓度累积较高,这促进了 nirS 型反硝化细菌的活动,故而在此时,厌氧氨氧化细菌的丰度明显低于 nirS 型反硝化细菌。而在四月份和九月份时,厌氧氨氧化细菌与主导反硝化的 nirS 型反硝化细菌丰度相差不大,此时亚硝酸盐的浓度低于仪器检测限以下,且通过相关性分析结果表明, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 与 nirS/Ca.scalindua16SrRNA 丰度比值呈显著负相关性($P < 0.05$),这说明厌氧氨氧化细菌与反硝化细菌对亚硝酸盐可能存在一定的竞争作用,使亚硝酸盐浓度严重偏低,这与前人的研究结果一致(Du *et al.*, 2017)。本研究通过分析四个月份的 nirS 型反硝化细菌与厌氧氨氧化细菌呈显著正相关性($P < 0.01$),并通过 CCA 分析表明,硝酸盐对 nirS、nirK 型反硝化细菌,以及厌氧氨氧化细菌均有着显著的正相关性,这表明硝酸盐可能是反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌共存的重要环境因子,这与 Li 等(2016)对于反硝化细菌与厌氧氨氧化细菌的研究结果一致。在厌氧环境条件下,硝酸盐能被反硝化作用还原为亚硝酸盐,这可为反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌提供底物,同时有研究表明,硝酸盐显著影响反硝化和厌氧氨氧化细菌群落结构(Wang *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2016)。综合上述分析推测,湛江湾栖息的厌氧氨氧化细菌和反硝化细菌之间存在一种特殊的竞争与共存的关系,且由铵盐、硝酸盐、亚硝酸盐、pH 等共同驱动。

研究发现 nirS 丰富度变化范围为 351.08—459.05,其结果大小顺序为 Z15 > Z17 > Z21 > Z06 > Z24,可以看出 nirS 型反硝化细菌丰富度从湛江湾湾内向湾口附近呈现先升高再降低的趋势,并在特呈岛旁的 Z15 站位有最大值,这可能是因为在 Z15 站位的周边有许多鱼虾养殖区,使得大量 DIN 的输入影响了 nirS 反硝化细菌的群落(Hong *et al.*, 2014); Shannon 指数分析表明,nirS 型反硝化细菌的群落多样性在 Z15 最大,位于宝钢钢铁厂排污口附近的 Z21 最低,且 nirS 型反硝化细菌四个月份平均丰度在 Z15 站位最高,而 Z21 的平均丰度最低,这可能表明 nirS 型反硝化细菌群落耐受污染能力较弱。nirK 型反硝化细菌丰富度范围为 244.14—449.25,其丰富度的平均值为(367.36±93.24),比 nirS 型反硝化细菌(408.89±40.66)低,这与 Jiang 等(2017)研究长江沉积物中反硝化细菌的结果

一致。Shannon 指数分析表明, nirK 型反硝化细菌的群落多样性在位于宝钢排污口的 Z21 站位最大, 而在位于东头山岛旁的 Z06 站位最小, 这可能揭示了 nirK 型反硝化细菌群落耐污染能力较强, 这与 nirS 型反硝化细菌相反, 且两者在四个月的基因平均丰度也表明, Z21 站位的 nirK 高于 nirS 型反硝化细菌。nirK 型反硝化细菌 Shannon 指数的平均值(4.32 ± 0.49)稍低于 nirS 型反硝化细菌(4.43 ± 0.37), 这与前人研究结果基本一致, 如长江沉积物(Jiang *et al.*, 2017)、湖泊沉积物(Saarenheimo *et al.*, 2015)。本研究中 nirS 的 Shannon 指数比长江沉积物(Zheng *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2017)、Chesapeake 海湾沉积物(Francis *et al.*, 2013)高。nosZ 丰富度范围为 405.50~569.95, 其结果大小为 $Z15 > Z17 > Z21 > Z06 > Z24$, 可以看出 nosZ 与 nirS 丰富度的变化趋势相同, 且其群落多样性在 Z15 最大, Z21 最小, 这与 nirS 型反硝化细菌的群落多样性变化一致。而对于厌氧氨氧化细菌而言, 其群落丰富度远低于反硝化细菌, Chao1 指数的平均值仅为 49.84 ± 4.32 , 在东头山岛旁的 Z06 站位最大, 而在火电厂旁的 Z24 站位最小; 其 Shannon 指数的平均值为 1.56 ± 0.56 , 且群落多样性在湾口附近的 Z21 站位最大, 在内湾的 Z24 站位最小, 且厌氧氨氧化细菌四个月的平均丰度在位于火电厂旁的 Z24 站位较之其他站位低了一个数量级, 靠近湾口的 Z18 站位丰度最高, 且湾口其他站位的丰度均较高于湾内, 说明湛江湾厌氧氨氧化细菌呈现出从湾口向湾内逐渐递减的趋势。厌氧氨氧化细菌群落多样性明显低于反硝化细菌, 这与 Li 等(2013)对于中国南海表层沉积物中 nirS 型反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌的研究结果一致。

通过分析反硝化细菌的 nirS、nirK、nosZ 基因的进化树(图 3—5), 发现在 nirS 基因进化树中, Cluster 中的 OTUs 跟许多栖息地中得到的序列有很高的相似性, 包括来自河口、水产养殖区、富营养化的海湾的沉积物。Cluster 中的这些 OTUs 遍及于诸多海域的沉积物中, 如胶州湾(Dang *et al.*, 2009), 说明这些 nirS 型反硝化细菌在海洋中是广泛分布的。在 Cluster 中, OTU14 和 OTU17 与九龙江和闽江、珠江口富营养化的河口沉积物中得到的序列有着很高的亲缘关系, 说明这两类反硝化细菌对盐度的适应能力很强, 在淡水和海水中都有存在, 这也从一定程度说明盐度影响了某些 nirS 型反硝化细菌的群落结构, 这也符合 Mosier 等(2010)在旧金山海湾河口的研究结果。同时本文发现 nirS 中包含的 OTUs 序列大多数与

来自河口区域的序列有很高的相似性, 如珠江口、九龙江河口、墨西哥河口、长江河口等流域。对于 nirK 基因, 其系统进化树分为 5 个 Cluster, 其中 Cluster 只包含 OTU12, 它与黄河河口沉积物、Fenghua 垃圾填埋场、湿地土壤获得的序列有着较高同源性, 说明该类 nirK 型反硝化细菌在陆地和海洋广泛分布, 且其对环境污染的适应能力很强。Cluster 包含三个 OTUs, 分别是 OTU18、OTU6、OTU10, 它们间的相似性为 96%—97%, 与旧金山河口沉积物(Mosier *et al.*, 2010)中所获得的序列有着一定的相似性(84%—87%)。Cluster 也只包含三个 OTUs, 分别为 OTU13、OTU3、OTU7, 它们与旧金山河口沉积物(Mosier *et al.*, 2010)获得的序列有一定的同源性(85%)。本研究发现在 Cluster 中包含 4 个 OTUs, 它们只与湿地土壤获得的序列有着很高的相似性(96%—100%), 说明这几类 nirK 型反硝化细菌之前在海洋里还未曾被发现, 是一类新奇的海洋 nirK 型反硝化细菌。对于 nosZ 基因, 其系统进化树结果表明, nosZ 型反硝化细菌主要属于 *Alpha-proteobacteria*, 这与 Castellano-Hinojosa 等(2017)在地中海区域的高山湖的研究结果一致。在 Cluster 中的 9 个 OTUs 与来自不同环境里得到的序列有一定的亲缘关系, 包括海洋沉积物、红树林湿地土壤、近海岸沉积物等, 说明这些 nosZ 型反硝化细菌存在于不同的生境中。Cluster 中只包含 OTU2、OTU41, 且它们只与从莱州湾沉积物中得到的序列有高亲缘关系, 说明这两类 nosZ 型反硝化细菌之前可能只存在于莱州湾海域, 本研究在湛江湾海域可能目前尚属于第二次发现这两类反硝化细菌。Cluster 只有 OTU7, 它与从湿地、草原土壤、及鄱阳湖沉积物中得到的序列有一定同源性, 说明该类 nosZ 型反硝化细菌之前只在陆地和淡水区域有发现, 本研究可能是首次在海洋里发现这类反硝化细菌。

对于厌氧氨氧化细菌而言, 其进化树主要分析了由沉积物样品中扩增的厌氧氨氧化 16SrRNA 基因, 一个以“*Candidatus Scalindua*”(图 6)为主的厌氧氨氧化群落。其进化树结果表明, 湛江湾地区的厌氧氨氧化细菌主要属于 *Candidatus Scalindua* sp., 以及浮霉菌门(*planctomycetes*), 这跟一些科学家以前在其他不同环境中的研究结果一致(Dang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013), 且它们具有较高的耐盐性, 存在于许多生境中, 如一些上升流水柱的低氧区和一些次低氧水体中(Schubert *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2007)。Cluster 包括 7 个

OTUs, 且 OTU10、OTU11、OTU13、OTU15 均未在 NCBI 数据库里找到与之相匹配的序列, 说明在湛江湾沉积物中栖息着一些还未曾被发现的新奇的厌氧氨氧化细菌。

4 结论

本研究发现, 在热带海湾反硝化细菌与厌氧氨氧化细菌之间存在特殊的竞争与共存的关系, 即当亚硝酸盐浓度较低时, 反硝化和厌氧氨氧化细菌丰度均比其他月份高, 且相关性分析结果表明亚硝酸盐与 *nirS*/Ca.sca1indua16SrRNA 丰度比值呈显著负相关性, 说明两者对亚硝酸盐可能存在竞争作用; 而四个月的 *nirS* 型反硝化细菌与厌氧氨氧化细菌丰度呈显著正相关性, 说明两者可能同时存在共存的关系, 且 CCA 分析结果表明, 硝酸盐可能影响反硝化和厌氧氨氧化细菌群落结构。系统进化分析结果表明在湛江湾海域栖息着一些新型的反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌, 这对于深入认识人类活动影响下的热带海湾中的反硝化和厌氧氨氧化细菌有着重要的意义。

参 考 文 献

- 施玉珍, 张瑜斌, 孙省利, 2015. 湛江湾富营养化分布特征及与环境因子的关系. 环境科学与技术, 38(12): 90—96, 122
- 袁 旗, 许振勇, 彭华强等, 2016. 湛江湾及其附近海域近 5 年海水中氮、磷变化趋势研究. 绿色科技, (24): 41—45
- 鲍士旦, 2008. 土壤农化分析. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 50—56
- Castellano-Hinojosa A, Correa-Galeote D, Carrillo P *et al*, 2017. Denitrification and biodiversity of denitrifiers in a high-mountain Mediterranean Lake. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1911
- Choi A, Cho H, Kim S H *et al*, 2016. Rates of N₂ production and diversity and abundance of functional genes associated with denitrification and anaerobic ammonium oxidation in the sediment of the Amundsen Sea Polynya, Antarctica. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 123: 113—125
- Dang H Y, Chen R P, Wang L *et al*, 2010. Environmental factors shape sediment anammox bacterial communities in hypernutrified Jiaozhou Bay, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21): 7036—7047
- Dang H Y, Wang C Y, Li J *et al*, 2009. Diversity and distribution of sediment *nirS*-encoding bacterial assemblages in response to environmental gradients in the eutrophied Jiaozhou Bay, China. *Microbial Ecology*, 58(1): 161—169
- Du R, Cao S B, Li B K *et al*, 2017. Performance and microbial community analysis of a novel DEAMOX based on partial-denitrification and anammox treating ammonia and nitrate wastewaters. *Water Research*, 108: 46—56
- Francis C A, O'Mullan G D, Cornwell J C *et al*, 2013. Transitions in *nirS*-type denitrifier diversity, community composition, and biogeochemical activity along the Chesapeake Bay estuary. *Frontiers in Microbiology*, 4: 237
- Henry S, Baudoin E, López-Gutiérrez J C *et al*, 2004. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 59(3): 327—335
- Henry S, Bru D, Stres B *et al*, 2006. Quantitative detection of the *nosZ* Gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8): 5181—5189
- Hong Y G, Xu X R, Kan J J *et al*, 2014. Linking seasonal inorganic nitrogen shift to the dynamics of microbial communities in the Chesapeake Bay. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(7): 3219—3229
- Jetten M S M, van Niftrik L, Strous M *et al*, 2009. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(2—3): 65—84
- Jiang X L, Yao L, Guo L D *et al*, 2017. Multi-scale factors affecting composition, diversity, and abundance of sediment denitrifying microorganisms in Yangtze lakes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(21): 8015—8027
- Kim H, Bae H S, Reddy K R *et al*, 2016. Distributions, abundances and activities of microbes associated with the nitrogen cycle in riparian and stream sediments of a river tributary. *Water Research*, 106: 51—61
- Klein D, 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8(6): 257—260
- Lee J A, Francis C A, 2017. Spatiotemporal characterization of San Francisco bay denitrifying communities: a comparison of *nirK* and *nirS* diversity and abundance. *Microbial Ecology*, 73(2): 271—284
- Lefebvre S, Marmonier P, Peiry J L, 2006. Nitrogen dynamics in rural streams: differences between geomorphologic units. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 42(1): 43—52
- Li F E, Li M C, Shi W C *et al*, 2017. Distinct distribution patterns of proteobacterial *nirK*- and *nirS*-type denitrifiers in the Yellow River estuary, China. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(8): 708—718
- Li J, Qiang Z M, Yu D S *et al*, 2016. Performance and microbial community of simultaneous anammox and denitrification (SAD) process in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 218: 1064—1072
- Li M, Hong Y G, Cao H L *et al*, 2013. Community structures and distribution of anaerobic ammonium oxidizing and *nirS*-encoding nitrite-reducing bacteria in surface sediments of the South China Sea. *Microbial Ecology*, 66(2): 281—296
- Meng H, Wang Y F, Chan H W *et al*, 2016. Co-occurrence of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane oxidation processes in subtropical acidic forest soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(17): 7727—7739
- Mosier A C, Francis C A, 2010. Denitrifier abundance and activity

- across the San Francisco Bay estuary. *Environmental Microbiology Reports*, 2(5): 667—676
- Oshiki M, Satoh H, Okabe S, 2016. Ecology and physiology of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Environmental Microbiology*, 18(9): 2784—2796
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10): 6829—6832
- Saarenheimo J, Tirola M A, Rissanen A J, 2015. Functional gene pyrosequencing reveals core proteobacterial denitrifiers in boreal lakes. *Frontiers in Microbiology*, 6: 674
- Schmid M C, Hooper A B, Klotz M G *et al*, 2008. Environmental detection of octahaem cytochrome *c* hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Environmental Microbiology*, 10(11): 3140—3149
- Schmid M C, Risgaard-Petersen N, van de Vossenberg J *et al*, 2007. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Environmental Microbiology*, 9(6): 1476—1484
- Schubert C J, Durisch-Kaiser E, Wehrli B *et al*, 2006. Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika). *Environmental Microbiology*, 8(10): 1857—1863
- Senga Y, Okumura M, Seike Y, 2010. Seasonal and spatial variation in the denitrifying activity in estuarine and lagoonal sediments. *Journal of Oceanography*, 66(1): 155—160
- Smith J M, Mosier A C, Francis C A, 2015. Spatiotemporal relationships between the abundance, distribution, and potential activities of ammonia-oxidizing and denitrifying microorganisms in intertidal sediments. *Microbial Ecology*, 69(1): 13—24
- Strous M, Fuerst J A, Kramer E H M *et al*, 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400(6743): 446—449
- Thamdrup B, 2012. New pathways and processes in the global nitrogen cycle. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43: 407—428
- Thamdrup B, Dalsgaard T, 2002. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3): 1312—1318
- Throbäck I N, Enwall K, Jarvis Å *et al*, 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(3): 401—417
- Wang L P, Liu L S, Zheng B H *et al*, 2013. Analysis of the bacterial community in the two typical intertidal sediments of Bohai Bay, China by pyrosequencing. *Marine Pollution Bulletin*, 72(1): 181—187
- Wang L P, Zheng B H, Nan B X *et al*, 2014. Diversity of bacterial community and detection of *nirS*- and *nirK*- encoding denitrifying bacteria in sandy intertidal sediments along Laizhou Bay of Bohai Sea, China. *Marine Pollution Bulletin*, 88(1—2): 215—223
- Wang Y, Zhu G B, Harhangi H R *et al*, 2012. Co-occurrence and distribution of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane-oxidizing bacteria in a paddy soil. *FEMS Microbiology Letters*, 336(2): 79—88
- Wenk C B, Brees J, Zopfi J *et al*, 2013. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria and sulfide-dependent denitrifiers coexist in the water column of a meromictic south-alpine lake. *Limnology and Oceanography*, 58(1): 1—12
- Zheng Y L, Hou L J, Liu M *et al*, 2015. Diversity, abundance, and distribution of *nirS*-harboring denitrifiers in intertidal sediments of the Yangtze Estuary. *Microbial Ecology*, 70(1): 30—40

ABUNDANCE, DIVERSITY, AND DISTRIBUTION OF DENITRIFIER AND ANAMMOX BACTERIA IN ZHANJIANG BAY SEDIMENTS

MAO Tie-Qiang¹, DONG Hong-Po², CHEN Fa-Jin¹, HOU Qing-Hua¹, ZHU Qing-Mei¹,
YANG Wen-Na¹, ZHANG Jia-Wei¹, JI Zi-Han¹, LING Wei-Qi¹

(1. College of Ocean and Meteorology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. State Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract The diversity and abundance of denitrifying bacteria and anammox bacteria in Zhanjiang Bay sediments were analyzed by real-time fluorescent quantitative PCR and high-throughput sequencing. The results show that the abundance of denitrifying bacteria and anammox bacteria in the sediments changed significantly in season and location. The nirS-type denitrifying bacteria were the highest in February and the lowest in April, and its average abundance tends to increase first and then decrease from inside to outside of the bay. The abundance of nirK-type denitrifying bacteria were the highest in September and the lowest in November. The nosZ-type denitrifying bacteria were the highest in April, and did not change in other months. The abundance of anammox bacteria were the highest in September and the lowest in February. Correlation analysis showed that nitrite and ammonium jointly regulated the changes of denitrifying and anammox bacteria abundances in the sediments. Phylogenetic analysis showed that there are some widely distributed denitrifying bacteria in Zhanjiang Bay, but certain novel nirK and nosZ-type denitrifying bacteria were also found. For anaerobic ammonium oxidizing bacteria, it mainly belongs to the Planctomycetes and *Candidatus scalindua*, which is high-salinity tolerated. In addition, a new branch of anammox bacteria inhabited in Zhanjiang Bay that are not found elsewhere. CCA analysis showed that nitrate significantly affected the community structure of denitrifying bacteria and anammox bacteria in the sediments. There are competition between denitrifying bacteria and anammox bacteria, which is driven by various environmental factors including nitrite, nitrate, and pH.

Key words denitrifier and anammox bacteria; real-time quantitative PCR; high-throughput sequencing; diversity; abundance; Zhanjiang Bay