

DOI:10.3876/j.issn.1000-1980.2016.05.012

小型浅水湖泊表层沉积物氨氧化古菌群落结构特征

燕文明¹, 刘 凌¹, 赵倩维², 杨艳青¹

(1. 河海大学水文水资源与水利工程科学国家重点实验室, 江苏 南京 210098;

2. 淮阴工学院交通工程学院, 江苏 淮安 223300)

摘要: 为更深入地了解氨氧化古菌(AOA)在浅水湖泊表层沉积物中的分布特征,以淮河流域下游里下河地区浅水湖泊为研究对象,采用分子生物学和微生物学方法研究了该区域4个不同功能类型的浅水湖泊中的AOA群落结构。结果表明,里下河地区的浅水湖泊中存在AOA,为AOA的全球地理分布生境提供了重要补充。大纵湖湖心处表层沉积物中AOA的多样性和丰富度最高,AOA主要聚集于Group 1.1b和Group 1.1a,其中71.3%的序列属于Group 1.1b,28.7%的序列属于Group 1.1a。沉水植物的存在明显增加了Group 1.1b的丰富度,丰富的有机质有利于促进AOA的生长。得胜湖岸周边的工厂、采沙场、渔业养殖以及九龙口上游家畜类养殖影响了表层沉积物中的群落特征。

关键词: 表层沉积物;氨氧化古菌;群落结构;污染物来源;多样性指数;丰富度指数;浅水湖泊;里下河地区

中图分类号:X524

文献标志码:A

文章编号:1000-1980(2016)05-0449-05

Characteristics of community structure of AOA in surface sediments of small shallow lakes

YAN Wenming¹, LIU Ling¹, ZHAO Qianwei², YANG Yanqing¹

(1. State Key Laboratory of Hydrology-Water Resources and Hydraulic Engineering, Nanjing 210098, China;

2. Faculty of Transportation Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223300, China)

Abstract: To investigate the distribution characteristics of ammonia-oxidizing archaea (AOA) in sediments of shallow lakes, we chose the shallow lakes in the Lixia River area, which is in the lower Huaihe River Basin, as the research object and studied the community structure of AOA in four shallow lakes with different functional types in the region using the methods of molecular biology and microbiology. The results show that there exists AOA in this region and this provides an important supplement to the global geographic distribution and habitat of AOA. In the surface sediments of this region, the diversity and richness of AOA is highest in the center of Dazong Lake. AOA is mainly accumulated in the groups 1.1b and 1.1a, in which, 71.3% of the sequences belong to Group 1.1b and 28.7% of the sequences belong to Group 1.1a. The presence of submerged plants significantly improves the richness of Group 1.1b, and abundant organic matter is conducive to promoting the growth of AOA. The surrounding factories, sandpits, fisheries, and the livestock breeding upstream of Jiulongkou affect the characteristics of the community in the surface sediments.

Key words: surface sediments; AOA; community structure; pollution sources; diversity index; richness index; shallow lake; Lixia River area

2008年,Herrmann等^[1]在淡水湖泊水生植物根际中发现了AOA,随后人们开始了对AOA的广泛研究,

收稿日期:2015-04-03

基金项目:国家自然科学基金(41301531,51279060)

作者简介:燕文明(1982—),女,江苏沛县人,高级实验师,博士,主要从事环境水文及水环境保护研究。E-mail:ywm0815@163.com

研究还发现具有氨氧化能力的氨氧化古菌(AOA)有 *amoA*^[2]。Prosser 等^[3]将 AOA 分为 3 类:海洋、大多数水体以及沉积物中的海洋环境硝化古菌群落(Group 1.1a),土壤及其他陆源环境中的土壤环境硝化古菌群落(Group 1.1b),嗜高温环境硝化古菌群落(Group 1.1c)。Pester 等^[4]将 AOA 序列划分为 5 个类群:*Nitrosocaldus* 类群、*Nitrosopumilus* 类群、*Nitrosotalea* 类群、*Nitrososphaera sister* 类群、*Nitrososphaera* 类群。Llirós 等^[5]指出在溶解氧含量较高的环境中,系统中的 AOA 多聚类于 Group 1.1b 和 Group 1.1a。Wu 等^[6]对太湖底泥的研究得出,该区域内的 AOA 多属于 Group 1.1b,有少量属于 Group 1.1a。浅水湖泊表层沉积物物理化学特性存在一定的差异,导致了其中的细菌群落结构不同^[7-8],AOA 的数量、多样性及其生存环境范围等多于 AOB^[9]。AOA 的多样性受到外界环境因素的制约,土壤类型^[10]、施肥处理^[11]、铵浓度^[12]等的变化都可能会引起 AOA 的丰富度和分布的改变。AOA 在氮循环中的作用和功能都已得到深入研究,而关于同一地区不同污染来源的沉积物 AOA 丰富度和群落分布的研究较少。笔者以里下河地区小型浅水湖泊表层沉积物为研究对象,应用微生物技术研究不同类型浅水湖泊表层沉积物中 AOA 的多样性及丰富度其群落分布特征,旨在更好地认识 AOA 的群落结构组成,为进一步研究 AOA 在浅水湖泊氮循环中的作用奠定基础。

1 试验材料与方法

1.1 采样点的布设与概况

在淮河下游里下河地区的得胜湖、九龙口、大纵湖布设 4 个采样点,编号分别为 DS、JLK、DZ、DZ5,如图 1 所示。每个采样点同时采集 3 个表层沉积物样品混合。各采样点受人类扰动作用和生物作用强度不同,沉水植物密度、围网养殖程度、工业废水以及面源污染的注入对湖泊的环境影响不同。DS 位于得胜湖中心,水深约 3.5 m,得胜湖为河道型湖泊,受岸边化肥厂和采沙场影响较大,湖面多被围隔养殖。JLK 位于九龙口入湖口,刚经过疏浚,水深 1.5 m,上游存在渔业养殖和家畜类养殖现象。DZ 位于大纵湖北部,水深约 2.1 m,围网养殖现象严重。DZ5 位于大纵湖湖心,水深约 1 m,水体清澈,茳草和金鱼藻等水生植物密布。

1.2 沉积物 DNA 的提取和 PCR 的扩增

称取冻干过筛后的沉积物样品 0.5 g,提取和纯化后,用预冷的 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次,重悬于灭菌的 TE 溶液中,终体积为 50 μ L, -20°C 保存。每个沉积物样品重复提取 3 次然后合并。将总 DNA 进行 10 倍稀释后作为模板。AOA 的 *amoA* 基因采用的特异性引物为 *amoAF* (5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3') 和 *amoAR* (5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3')^[1],以提取纯化后的 DNA 作为模板,进行 25 μ L 体系扩增。

1.3 克隆文库构建

(a)纯化。使用 *PromegaAgarose Gel* DNA 纯化试剂盒对 PCR 扩增产物进行切胶纯化。(b)连接与转化。将 PCR 回收产物与 *pGEMTeasy* 载体进行连接后转入 JM109 感受态细胞。(c)筛选。进行蓝白筛选。(d)挑菌。AOA 选取 40 个白色克隆。(e)验证。将通用引物 T7、SP6 作为载体,PCR 扩增鉴定阳性克隆。(f)测序。挑取代表菌株进行测序(3 500,ABI,USA)。(g)比对。使用 DOTUR 软件获得分类操作单元(Operational Taxonomic Units,OTUs)后,每个 OTU 类型选取一个代表序列在 GenBank 上进行 BLASTn 相似性比对,挑选相似性最高的序列为参比序列。获得的 AOA 核酸序列登录号为:KM516351-KM516472。

1.4 系统发育分析

应用 DOTUR 软件对每个文库单独计算操作分类单元(OTUs),选取每个 OTU 中最具代表性的序列,通过 BLAST 搜索 GenBank 中最相似序列进行比对,并参照有关文献,选取参照序列,再用 ClustalX 1.8 进行多

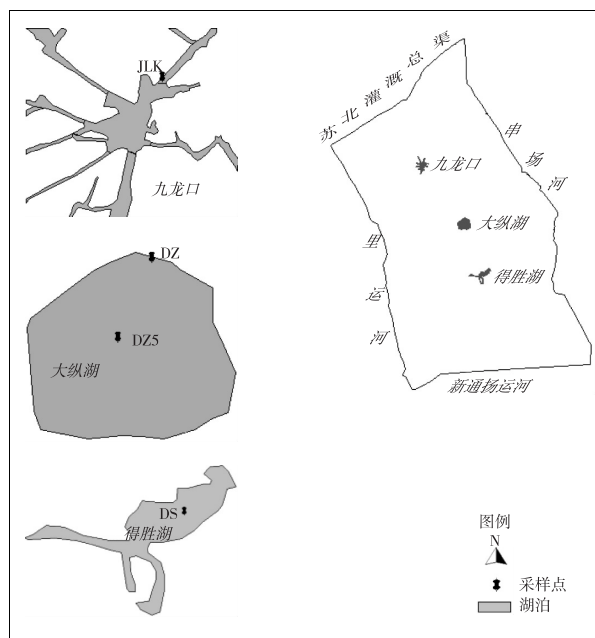


图 1 研究区典型湖泊位置与采样点位置

Fig. 1 Locations of typical lakes and sampling points in study area

序列比对。应用 Jukes-Cantor 参数模型计算进化距离^[13],运用 MEGA5.0 软件的 Kimura 2-parameter 校正模型检验不同的进化距离,并进行两两比对,通过 Kimura 2 邻接法构建系统发育树^[14],进化树的可靠性采用自举法进行评估,自举值设为 1 000 次。通过 DOTUR 软件计算 Shannon-Weiner 指数、Simpson 多样性指数、SACE 丰富度指数和 Schao1 丰富度指数等。克隆库的覆盖率由公式 $C=[1-(n_1/N)]\times 100\%$ 计算,其中 n_1 是 OTUs 的数目, N 为总克隆数^[15]。

2 结果与讨论

2.1 水环境特征

试验分析得出 4 个采样点的水环境特征见表 1。得胜湖的 TN、NO₃⁻+NO₂⁻ 最高,与其周边面源污染和工厂废水的输入有关。JLK 的 NH₄⁺、NO₃⁻ 较高,可能是因为疏浚时的搅动导致了湖泊内源氮暴发性释放;另外,搅动也可能会加快固定态铵向氨氮的转化以及硝化反应的进行。大纵湖的可交换态氮最小,是水生植物的同化吸收所致。采样时间为 9 月,多雨季节,得胜湖和九龙口湖泊入水中由雨水、工厂废水和生活污水带来的周围农田化肥、农药等面源污染的量都有所增加,以及围网养殖剩余的饲料、鱼虾所排废物等都可能增加氮含量。得胜湖上覆水中 TP、PO₄³⁻ 最高,与养殖废水和工业污水的输入有关;九龙口的 TP、PO₄³⁻ 较低,与疏浚有关。DS 的总磷最大,与工厂排出的废水中有含磷污染物有关。

表 1 水中营养盐和有机质含量
Table 1 Concentration of nutrients and organic matter in water mg/L

采样点	$\rho(\text{TN})$	$\rho(\text{NO}_3^-+\text{NO}_2^-)$	$\rho(\text{NH}_4^+)$	$\rho(\text{TP})$	$\rho(\text{PO}_4^{3-})$	$\rho(\text{TOC})$
DS	5.41	0.85	0.67	0.21	0.18	6.27
JLK	2.98	0.56	2.49	0.14	0.09	6.15
DZ	2.93	0.28	0.32	0.11	0.05	7.77
DZ5	3.05	0.49	0.29	0.14	0.08	6.60

2.2 氨氧化古菌 amoA 基因的多样性分析

研究中所选取的里下河地区浅水湖泊表层沉积物中微生物总 DNA 提取较完整,进行 PCR 扩增,经胶回收纯化和克隆测序分析,序列长度为 629 bp。BLAST 比对发现 PCR 产物序列与其他不可培养 AOA 的 amoA 基因同源性达到 99%,证明了里下河地区得胜湖、九龙口和大纵湖表层沉积物中存在 AOA。在对 AOA 进行扩增后,各 40 个克隆进行测序,得到目的序列克隆数分别为 27(DS)、40(DZ)、39(DZ5)和 16(JLK)。由于 JLK 表层沉积物的质粒较为复杂,得到的目的序列较少,只有 16 个,无法使用 DOTUR 软件计算其多样性指数。本文仅对 DS、DZ 和 DZ5 中的 AOA 按 99%的同源性划分为 8 个、9 个和 14 个 OTUs,并计算每一个 OTU 的 SACE 丰富度指数、Schao1 丰富度指数、Shannon-Wiener 多样性指数、Simpson 多样性指数。研究中 DS、DZ 和 DZ5 中的 AOA 克隆文库覆盖率较高(表 2),均大于 65%,表明文库包括了大多数 AOA 的 amoA 基因类型。通过表 2 可知 DZ5 中 AOA 的 Shannon-Wiener 多样性指数、Simpson 多样性指数最大。DZ 的 Shannon-Wiener 多样性指数和 Simpson 多样性指数最小。比较分析可知,DZ5 的 AOA 多样性和丰富度最高,而 DZ 和 DS 多样性和丰富度较低。

表 2 氨氧化古菌 amoA 的多样性
Table 2 Diversity of ammonia-oxidizing archaea amoA

采样点	分类操作 单元数/个	克隆文库 覆盖率/%	Shannon-Wiener 多样性指数	Simpson 多样性指数	SACE 丰富度指数	SChao1 丰富度指数
DS	8	71	1.9	7.1	8.5	8
DZ	9	78	1.8	4.8	9.4	9
DZ5	14	65	2.3	9.6	21.6	19

2.3 amoA 基因的系统发育分析

按 99%同源性将 4 个采样点的 AOA 划分为 16 个 OTUs,BLAST 寻找有相似来源的参比序列,用 Mega5 软件构建系统发育树。研究中的 AOA 主要聚集于 Group 1.1b 和 Group 1.1a。在 122 个目的序列中,有 87 个属于 Group 1.1b,占 71.3%。这 87 个序列里有 25 个是从 DS 中分离得到的,有 4 个是从 JLK 中分离得

到的,从 DZ 和 DZ5 中分离得到的序列分别为 21 个和 37 个。有 35 个序列属于 Group 1. 1a,占 28. 7%。DS、DZ、DZ5 和 JLK 中 AOA 属于 Group 1. 1a 的目的序列分别有 2 个、19 个、2 个和 12 个。可见,DS 和 DZ5 中的 AOA 以 Group 1. 1b 为主,DZ 中 AOA 的 Group 1. 1a 和 Group 1. 1b 所占比例相差不大,JLK 以 Group 1. 1a 为主。Group 1. 1b 的 87 个序列中有 85 个被聚类为 111clone5D 11 GenBank(EU671952)和 222cloneCFSAOA-24 GenBank(GQ906649)这 2 个亚类。其中,被聚类为前者的序列有 13 个,来自于 DS、DZ 和 DZ5 的分别有 5 个、2 个和 6 个;被聚类为后者的序列有 72 个,来自于 DS、DZ、DZ5 和 JLK 的分别有 20 个、19 个、30 个和 3 个。16 个 OTUs 中,只有属于 *Nitrososphaera* 类群的 OTU1 在所有样品中都存在,占 21. 3%,数量最多,与在长江口底泥样品发现的 AOA 序列高度相似。Group 1. 1b 的 87 个序列被聚为 11 个 OTUs,参考序列有来自废水处理系统的 KJ496929,洞庭湖沉积物 KC108808,河流底泥 KF857068,长江口底泥 KC735552、KC735379 和 KC735383,京杭大运河底泥 KF537016,巢湖出口处的底泥 JQ698526. 1,红树林土壤 KF169744。*Nitrosopumilus* 类群的 35 个序列被分为 5 个 OTUs,参考序列分别是来自热带河口沉积物中分离得到的 FJ601570,高山湖泊的 KF898586 和 KC735494,长江口的 KJ005026 和 KF413247。16 个 OTU 的代表序列与各自参比序列的基因片段在核苷酸水平上的同源性均为 99%,有高相似性。

里下河地区 AOA 的 *amoA* 基因序列与来源于土壤的 *Nitrososphaera viennensis* (FR773159) 和 *Uncultured crenarchaeote Forsmid 54d9* (AJ627422) 的相似性良好,达到了 97% 以上,与热泉中富集的 *Nitrososphaera gargensis clone RHGCaA18c* (EU281319) 的相似性良好^[6],达到了 93%;与从西雅图海洋水族馆中成功分离的海洋 AOA 菌株 *Nitrosopumilus maritimus SCM1* 的相似性为 71%^[16],相似性较差。在 122 个目的序列中,有 71. 3% 序列属于 Group 1. 1b,28. 7% 的序列属于 Group 1. 1a。Schleper^[17] 指出海洋、大多数水体以及沉积物来源的 AOA 聚类于 Group 1. 1a;土壤及其他陆源环境来源的 AOA 聚类于 Group 1. 1b。可见,里下河地区的 AOA 以土壤和其他陆源环境来源为主。4 个采样点中,DS 的 AOA 以 Group 1. 1b 为主,占 92. 6%,结合得胜湖是河道型湖泊,受周边环境的影响较大,可知该采样点 AOA 以土壤及其他陆源环境来源为主;而位于大纵湖湖心的 DZ5 的 Group 1. 1b 也较多,占 94. 9%,由于该点位于湖心,其氨 AOA 来源于陆源环境的可能较小,Group 1. 1b 类群丰度较大可能与该点丰富的沉水植物有关。

通过系统发育分析可知,DZ5 中 AOA 的多样性和丰富度最高,而 DZ 和 DS 较低。DZ5 水生植被较为旺盛,死亡后腐烂沉积于湖底,沉积物中 TN 很高,是 DS、DZ 和 JLK 的 2 倍以上,结合 DZ5 的实际情况,沉水植物明显增加了 Group 1. 1b 的丰富度。沉水植物的存在也导致了 DZ5 中 AOA 的多样性和丰富度明显高于 DS 和 DZ。可见,表层沉积物中丰富的有机质含量有利于促进 AOA 的生长。也有研究指出沉积物中的有机质含量较高可能会对 AOA 起到抑制作用^[16],这一点与本文的结论相反。DZ 的 Group 1. 1b 和 Group 1. 1a 差别较小,说明该采样点 AOA 的来源以陆源环境以及自身的水体和沉积物为主。

在对 DS 和 JLK 所挑取的 40 个代表菌株进行测序后,发现测序结果分别只有 27 个和 16 个是 AOA 的序列,其他序列均能找到 AOA 基因的扩增引物,但序列比对结果是质粒序列,这可能是样品的质粒上有引物结合位点所致。DS 和 JLK 所处的环境与 DZ 和 DZ5 差异较大。DS 采自河道型湖泊,受岸边的工厂、采沙场以及湖面围网养殖的影响较大。JLK 位于九龙口南部入湖口,所在的湖区刚经过底泥疏浚,上游区域主要有渔业养殖和家畜类养殖。这些都有可能对表层沉积物中的群落结构分布造成较大影响。所以需要寻找并添加新的特异引物对用于克隆前的 PCR 扩增,使得克隆文库具有足够的覆盖率,进而更为准确地反应沉积环境中 AOA 的群落结构特征。而 DZ 位于大纵湖的出湖口,DZ5 位于湖心,这 2 个采用点的表层沉积物中 AOA 的群落分布结构特征与一般的浅水湖泊或者河口有一定的相似性,用通用的特异性引物对基本可以使得克隆序列具有良好的覆盖率。因此,要想更为细致准确地研究 DS 和 JLK 中的 AOA,还需要寻找合适的特异性引物以满足构建克隆文库需要。

3 结 论

a. 淮河流域下游的里下河地区浅水湖泊表层沉积物中存在 AOA,为 AOA 的全球地理分布生境的提供了重要补充。

b. 大纵湖、九龙口和得胜湖的 AOA 主要聚集于 Group 1. 1b 和 Group 1. 1a,有 71. 3% 的序列属于 Group 1. 1b。

c. 大纵湖湖心表层沉积物中的 AOA 多样性和丰富度最高。沉水植物的存在明显增加了 Group 1. 1b 的丰富度,丰富的有机质有利于促进 AOA 的生长。

参考文献:

- [1] HERRMANN M, SAUNDERS A M, SCHRAMM A. Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(10): 3279-3283.
- [2] FRANCIS C A, ROBERTS K J, BEMAN J M, et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(41): 14683-14688.
- [3] PROSSER J I, NICOL G W. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 2931-2941.
- [4] PESTER M, RATTEI T, FLECHL S, et al. AmoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions [J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(2):525-539.
- [5] LLIROS M, GICH F, PLASENCIA A, et al. Vertical distribution of ammonia-oxidizing crenarchaeota and methanogens in the epipelagic waters of Lake Kivu (Rwanda-Democratic Republic of the Congo) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(20):6853-6863.
- [6] WU Yucheng, XIANG Yan, WANG Jianjun, et al. Heterogeneity of archaeal and bacterial ammonia-oxidizing communities in Lake Taihu, China[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(4):569-576.
- [7] 侯俊,王超,王沛芳,等. 太湖表层沉积物粒度组成时空分布特征及分类命名[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2013, 41(2):114-119. (HOU Jun, WANG Chao, WANG Peifang, et al. Temporal variability and spatial distribution of granulometric composition of surface sediments and classification in Taihu Lake[J]. *Journal of Hohai University (Natural Sciences)*, 2013, 41(2):114-119. (in Chinese))
- [8] 赵大勇,孙一萌,方超,等. 太湖梅梁湾不同深度沉积物中细菌群落结构组成[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2013, 41(4): 283-287.(ZHAO Dayong, SUN Yimeng, FANG Chao, et al. Vertical distribution of bacterial community composition in sediments of Meiliang Bay in Taihu Lake[J]. *Journal of Hohai University (Natural Sciences)*, 2013, 41(4): 283-287. (in Chinese))
- [9] CHEN Xueping, ZHU Yongguan, XIA Yue, et al. Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(8):1978-1987.
- [10] 张秋芳,徐继荣,苏建强,等. 河口生态系统氨氧化菌生态学研究进展[J]. 生态学报, 2012(18): 5878-5888. (ZHANG Qiufang, XU Jirong, SU Jianqiang, et al. Research progress on ammonia-oxidizing microorganisms in estuarine ecosystem[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012(18): 5878-5888. (in Chinese))
- [11] LEININGER S, URICH T, SCHLOTTER M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils [J]. *Nature*, 2006, 442:806-809.
- [12] YANG J B, LI X C, XU L, et al. Influence of the nitrification inhibitor DMPP on the community composition of ammonia-oxidizing bacteria at microsites with increasing distance from the fertilizer zone [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, 49(1):23-30.
- [13] LI X R, XIAO Y P, REN W W, et al. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in different types of soil in the Yangtze River estuary [J]. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 2012, 13(10):769-782.
- [14] KUHNER M K, FELSENSTRIJN J. A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates [J]. *Molecular biology and evolution*, 1994, 11(3):459-468.
- [15] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10):2731-2739.
- [16] ZENG J, BIAN Y Q, XING P, et al. Macrophyte species drive the variation of bacterioplankton community composition in a shallow freshwater lake [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(1):177-184.
- [17] SCHLEPER C, JURGENS G, JONUSCHEIT M. Genomic studies of uncultivated archaea [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(6):479-488.