

研究报告

九龙江河口区 *nirS* 型反硝化细菌多样性及系统发育学分析

洪璇^{1,2} 洪有为³ 陈仲巍² 赵春贵¹ 杨素萍^{1*}

(1. 华侨大学 生物工程与技术系 福建 厦门 361021)

(2. 厦门医学高等专科学校 药学系 福建 厦门 361008)

(3. 中国科学院城市环境研究所 福建 厦门 361021)

摘要:【目的】结合 16S rRNA 基因克隆文库和 *nirS* 基因克隆文库的分析,揭示九龙江河口区 *nirS* 型反硝化细菌多样性。【方法】选取九龙江河口区一富营养化采样点,分别采集水样及沉积物样品,进行理化因子的测定并提取细菌总 DNA。以水样 DNA 构建 16S rRNA 基因克隆文库,以沉积物 DNA 构建 *nirS* 基因克隆文库,分析微生物群落结构的多样性并构建系统发育树。【结果】从 16S rRNA 基因克隆文库中获得 86 条有效序列,按 97% 的序列相似性划分为 53 个 OTU,分别属于 Proteobacteria 门、Planctomycetes 门、Bacteroidetes 门、Actinobacteria 门、Firmicutes 门和 Chloroflexi 门。其中属于 Proteobacteria 门 OTU 的克隆子占克隆数的 62.9%,是最优势的类群,分属于 Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria 和 Deltaproteobacteria 纲等。从 *nirS* 基因克隆文库中获得 190 条有效序列,翻译为氨基酸序列后,按 82% 的序列相似性划分为 60 个 OTU,并定位到属的水平。其中 Proteobacteria 门是最优势的类群,占文库克隆子总数的 71.6%,包括 Alphaproteobacteria 纲(5.8%)、Betaproteobacteria 纲(49.0%)和 Gammaproteobacteria 纲(16.9%)。*nirS* 基因克隆文库中丰度最高的 OTU 与 GenBank 中的一株可培养反硝化菌 *Thauera* sp. R-26906 具有 100% 的序列相似性。【结论】九龙江河口区的微生物以及亚硝酸盐还原酶基因(*nirS*)具有丰富的多样性。大部分 NirS 序列在 GenBank 中的最相似序列来源于河口、海湾等相似的环境。

关键词: 反硝化细菌, *nirS* 基因, 微生物多样性, 河口区, 系统发育分析

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项项目(No. 201505026); 中国科学院城市环境与健康重点实验室基金项目(No. KLUEH201005); 福建省教育厅科技项目(No. JB11275)

*通讯作者: Tel: 86-592-6166178; 信箱: yangsuping@hqu.edu.cn

收稿日期: 2014-11-27; 接受日期: 2015-01-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-01-23

Phylogenetic diversity of *nirS*-type denitrifying bacteria in Jiulong River estuary

HONG Xuan^{1,2} HONG You-Wei³ CHEN Zhong-Wei²
ZHAO Chun-Gui¹ YANG Su-Ping^{1*}

(1. Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021, China)

(2. Department of Pharmacy, Xiamen Medical College, Xiamen, Fujian 361008, China)

(3. Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Science, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract: [Objective] To understand the microbial community of denitrifying bacteria in Jiulong River estuary. [Methods] The sampling site was in Jiulong River estuary that was characterized by eutrophication. The water sample and sediment sample were collected and the environmental physicochemical factors were analyzed. The 16S rRNA gene and *nirS* gene clone libraries were constructed based on water sample and sediment sample respectively. [Results] In the 16S rRNA gene clone library, 86 valid sequences were grouped into 53 OTUs based on 97% sequence similarity and clustered into 6 different bacterial groups on the phylum level: Proteobacteria (Alpha, Beta, Gamma and Delta), Planctomycetes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes and Chloroflexi. Among these groups, Proteobacteria was the predominant member (62.9%). Of the *nirS* gene clone library 190 valid sequences were translated to conceptual amino acid sequences and group into 60 OTUs based on 82% similarity for genus identification. Among the 190 sequences, 71.6% were clustered into Proteobacteria phylum, including Alphaproteobacteria (5.8%), Betaproteobacteria (49.0%) and Gammaproteobacteria (16.9%). The most abundant OTU shared 100% sequence similarity to sequences from the nitrite reductase of *Thauera* sp. R-26906, a species of cultured denitrifier. [Conclusion] High diversity of the microbial community as well as *nirS* genes were found in the Jiulong River estuary. Most of the *NirS* sequences of this study shared quite high similarity to known sequences from various similar environments such as estuary and gulf.

Keywords: Denitrifying bacteria, *nirS* gene, Diversity of microbial community, Estuary, Phylogenetic analysis

河口区是将人类活动所带来的氮素从陆地向海洋转移的重要渠道。近年来工业和农业污染物的过度排放导致河口区富营养化程度加重。反硝化作用是微生物将硝酸盐或亚硝酸盐还原为 NO、N₂O 和 N₂ 的过程,作为重要的脱氮以及减轻富营养化的途径,日益引起人们的重视。由于参与反硝化作用的主要是兼性异养厌氧微生物^[1],所以我们有必要更好地了解河口区反硝化微生物菌群结构。

亚硝酸盐还原酶(Nir)是反硝化过程中最关键的酶^[2]。反硝化细菌中的亚硝酸盐还原酶根据它所包含的辅基不同可以分为含有细胞色素 cd1 的 NirS 和含铜的 NirK^[3]。目前发现的可培养反硝化菌中有 3/4 属于 *nirS* 型,并且该类型的反硝化菌多样性更丰富,分布更为广泛^[4-5]。

然而,*nirS* 基因与种群并不存在对应关系,同一个种群中可能只有部分微生物具有 *nirS* 基因。这就意味着,无法从系统发育学上推断某个微生物是否属于反硝化细菌^[6]。由于自然界中的大多数反硝化菌目前尚不可培养,所以传统的基于培养技术的方法无法系统和深入地研究反硝化菌群结构。目前已经发现超过 50 个属的细菌具有反硝化功能^[7],所以采用基于 16S rRNA 基因的方法研究反硝化菌群结构同样存在很大困难。相比之下,基于功能基因 *nirS* 的方法更为准确,它能够有效地揭示海洋、海湾、河流、湿地等不同环境中的反硝化菌群结构^[8]。

九龙江(116°50′–118°02′E, 24°12′–25°44′N)是我国东南部最大的河流,是福建省南部的的主要饮用水源,流域面积人口约 900 万人。近年来,工业和

农业废弃物的排放,导致九龙江河口呈现重度富营养化。在过去的研究中表明,九龙江河口区的年平均反硝化速率为 $10 \text{ kg N}/(\text{hm}^2 \cdot \text{a})^{[9]}$,与其他地区相比处于高水平,反硝化作用活跃进行。因此,研究九龙江河口区反硝化菌群结构,有助于进一步研究河口区对氮的自净能力,对治理氮的富营养化有重要的指导作用。

过去关于九龙江河口区微生物群落结构的研究大多是基于 16S rRNA 基因的研究,如九龙江流域浮游微生物的研究^[10]、潜在病原菌分析^[11]、九龙江河口区古菌结构的研究^[12]等,针对反硝化菌群结构的研究较少,尚未见到将 *nirS* 基因定位到属的水平后在多样性和系统分类上的研究。本研究的主要目的是结合 16S rRNA 基因克隆文库和 *nirS* 基因克隆文库的分析,探索九龙江河口区 *nirS* 型反硝化细菌的多样性。这对于进一步研究反硝化菌群与环境因子之间的关系、应用反硝化菌作为水体富营养化指示剂、以及含氮的富营养化水体的生物修复具有重要作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

聚碳酸酯膜, Millipore 公司; Water DNA Kit、Soli DNA Kit, OMEGA 公司; 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、pMD-18-T 克隆载体, TaKaRa 公司。

1.2 样品的采集处理及水质理化性质测定

采样点位于福建省九龙江河口区 ($117^{\circ}55'36''\text{E}$, $24^{\circ}26'8''\text{N}$)。获取表层(0.5 m)水样以及水下 2 m 深底泥沉积物。将水样用 $40 \mu\text{m}$ 孔径的尼龙膜进行粗过滤,以去除沙粒等大颗粒杂质。水样滤液及底泥沉积物放置在 4°C 保温箱内,及时运回实验室在 24 h 内完成样品分析。样品采集、保存和分析方法均按《海洋调查规范》和《海洋监测规范》中规定的有关方法进行(国家海洋局, 2007)。氨氮的测定采用纳氏试剂比色法(GB7479-1987),硝氮的测定采用紫外分光光度法,亚硝氮的测定采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法(GB7493-87),溶解性磷酸

盐的测定采用钼酸铵分光光度法(GB11893-1989)。

1.3 DNA 的提取、PCR 扩增及克隆文库构建

将水样滤液再用孔径为 $3 \mu\text{m}$ 的聚碳酸酯膜过滤,除去大多数原生动物和藻类后,用 DNA 提取试剂盒提取水样中细菌的 DNA。底泥沉积物以土壤 DNA 提取试剂盒提取细菌总 DNA。

为了获得采样点当前的微生物菌群结构总貌,了解水体污染程度对菌群结构的即时影响,采用水样进行 16S rRNA 基因克隆文库的构建。16S rRNA 基因的全长扩增采用细菌通用引物 27f ($5'\text{-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'}$) 和 1391r ($5'\text{-GACGGGCGGTGTGTRCA-3'}$)^[13],获得约 1.4 kb 的基因片段。为了更准确地反映长期污染累积效应下的反硝化菌群结构,采用沉积物样品进行 *nirS* 基因克隆文库的构建。*nirS* 基因片段的扩增采用引物 d3aF [$5'\text{-T(C/G)AACGT(C/G)AAGGA(A/G)AC(C/G)GG-3'}$]和 R3cd [$5'\text{-GA(C/G)TTCGG(A/G)TG(C/G)GTCTTGA-3'}$]^[14],获得约 425 bp 的基因片段。50 μL PCR 反应体系: 2.5 mmol/L 的 dNTPs 4 μL , 25 mmol/L 的 MgCl_2 4 μL , $10\times\text{PCR}$ 反应缓冲液 5 μL , 25 $\mu\text{mol/L}$ 的引物 1 μL , 20 ng 的模板, *Taq* DNA 聚合酶 2 U, 高纯水补足 50 μL 。PCR 扩增程序为: 94°C 2 min; 94°C 30 s, 55°C (16S rRNA 基因)或 57°C (*nirS* 基因) 1 min, 72°C 1 min, 共 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 扩增产物经过琼脂糖电泳后,割胶纯化,连接到 pMD-18-T 克隆载体,再转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中,经过蓝白斑筛选获得阳性克隆,构建 16S rRNA 基因和 *nirS* 基因克隆文库。

1.4 克隆文库分析

从 16S rRNA 基因克隆文库中随机挑选 100 个阳性克隆,以 27f 为引物测序一个反应,获得约 850 bp 的序列。从 *nirS* 基因克隆文库中随机挑选 200 个阳性克隆,以 M13 为引物测序,并用 Transeq 软件将 DNA 序列翻译为氨基酸序列。通过 MEGA 软件将这些序列与 GenBank 数据库中最相似的序

列进行比对^[15]。在 DOTUR 软件的辅助下, 分别根据 97%和 82%的相似性将 16S rRNA 基因序列和 NirS 序列划分为不同的操作分类单元^[16] (Operational taxonomic unit, OTU), 在每个 OTU 中随机选取一个代表克隆, 构建系统发育树。计算每个文库的多样性指数^[17] (Shannon-Weiner, Simpson)、丰富度指数^[18] (Abundance-based coverage estimator; Biascorrected)和文库覆盖率。

1.5 核酸序列登录号

本研究中所得的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库中的登录号为 KC006066–KC006151, *nirS* 基因序列登录号为 JX660492–JX660579、JX660581–JX660673、JX660675、JX660677–JX660684。

2 结果与分析

2.1 环境因子测定结果

环境因子数据如表 1 所示, 水样及沉积物样品中氨氮、硝氮、亚硝氮和溶解性磷酸盐的含量均较高, 呈现富营养化。水样中总氮含量为 1.623 mg/L, 根据《中华人民共和国地表水环境标准》, 属于 IV 类标准。

2.2 16S rRNA 基因的多样性

从 16S rRNA 基因克隆文库中随机挑选 100 个阳性克隆进行测序, 获得 86 条有效序列。以序列相似性 97%为标准, 划分为 53 个 OTU, 并构建系统发育树(图 1)。Simpson 指数为 0.02, Shannon-Weiner 指数为 3.74, 多样性指数的分析表明该 16S rRNA 基因克隆文库具有丰富的多样性(表 2)。

86 条有效序列分属于 6 个门 9 个纲:

Proteobacteria 门(Alpha、Beta、Gamma 和 Delta 纲), Planctomycetes 门 Planctomycetia 纲, Bacteroidetes 门 Flavobacteriia 纲, Actinobacteria 门 Actinobacteria 纲, Firmicutes 门 Bacilli 纲和 Chloroflexi 门 Chloroflexi 纲(图 2A)。Proteobacteria 门占 62.9%, 是最优势的类群。在 Proteobacteria 门中, Alpha 纲占 55.5%, Beta 纲占 16.7%, Gamma 纲占 25.9%, Delta 纲占 1.9%。克隆文库中丰度最高的 OTU 为 OTU43, 占克隆子总数的 10.5%, 它与 GenBank 中的一株来源于海洋的放线菌 *Candidatus Actinomarina* (KC811143.1)具有 99%的序列相似性。其次为 OTU35, 占克隆子总数的 5.8%, 与从深海中分离获得的一株 Alpha proteobacterium SCGC AAA298-J15 (HQ675246)具有 99%的序列相似性。OTU28 和 OTU32 各占克隆子总数的 4.7%。OTU28 与 GenBank 中另一株从深海中分离获得 Alpha proteobacterium SCGC AAA298-K06 (HQ675249)具有 99%的序列相似性。OTU32 的最相似序列(97%的序列相似性)为一株从河口区红树林沉积物中分离获得的苯酚降解菌(EU697081), 而本研究采样点附近的龙海红树林自然保护区也曾被报道遭受多环芳香族化合物污染^[19]。

2.3 NirS 序列的多样性

从 *nirS* 基因克隆文库中随机挑选 200 个阳性克隆测序, 经过嵌合体的比对后, 获得 190 条有效序列。根据 Palmer 的方法^[20-21], 采用 82%作为序列相似性标准, 可以将 NirS 序列定位到属的水平。因此将翻译后的氨基酸序列以 82%的序列相似性标准划分为 60 个 OTU。文库覆盖率为 81%, Simpson 指数为 0.05, Shannon-Weiner 指数为 3.47 (表 2)。

表 1 采样点的环境测定
Table 1 Environmental parameters at the sampling sites

样品 Sample	酸碱度 pH	氨氮 NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	硝氮 NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	亚硝氮 NO ₂ ⁻ -N (mg/L)	磷酸盐 PO ₄ ³⁻ -P (mg/L)
水样 Water sample	7.54	0.705	0.661	0.257	10.5
沉积物 Sediment sample	7.41	0.684	0.672	0.235	10.8

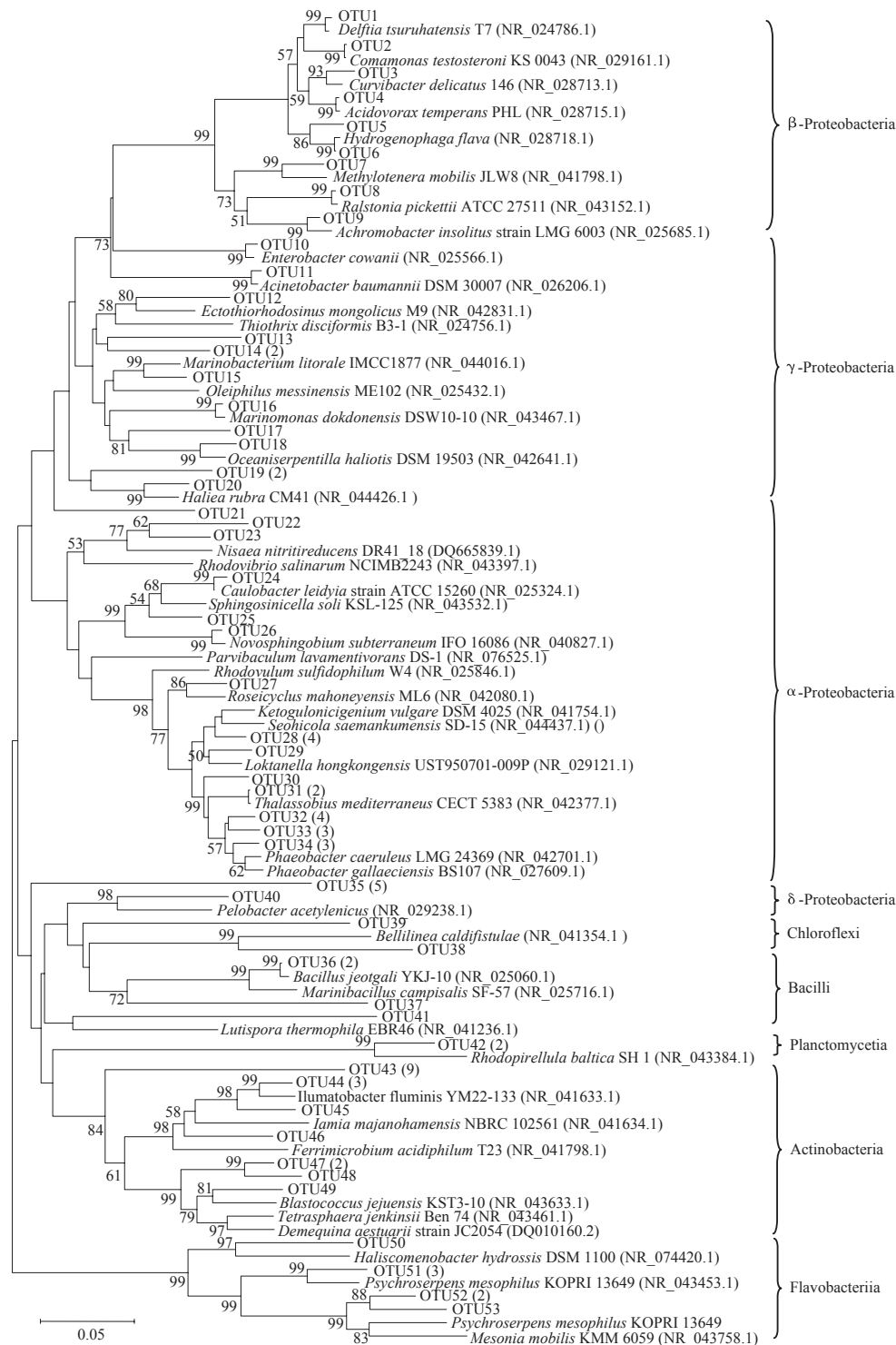
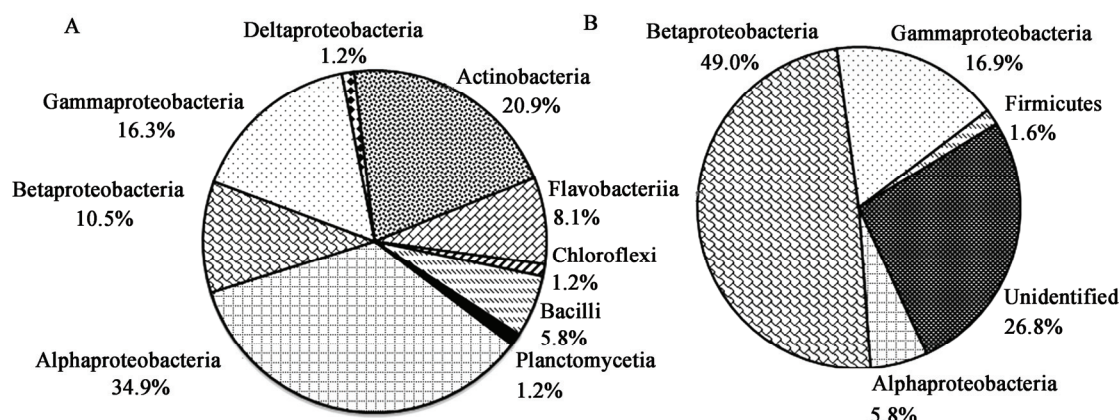


图1 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

注: 以 97% 的序列相似性划分 OTU, 每个 OTU 随机挑选一条代表序列与 GenBank 中的最相似序列一起用于构建 16S rRNA 基因系统发育树. OTU 名称后括号内的数字表示该 OTU 内的序列数(没标注的表示仅含一条序列的 OTU). 在树节上的数字代表 1 000 取样的百分比, 仅显示大于 50% 的情况.

Note: Phylogenetic tree was constructed based on 16S rRNA gene sequences of the representatives of each OTU at 3% cut off and their closest relatives from GenBank. Numbers in parenthesis behind the names of OTUs refer to the number of sequences belonging to each OTU. The OTUs containing only one sequence were not labeled. Bootstrap values above 50% for 1 000 replicates are shown at branch points.

图2 16S rRNA 基因和 *nirS* 基因克隆文库在纲水平的分布Figure 2 Taxonomic distribution of 16S rRNA gene and *nirS* gene clone libraries on the level of class

注: A: 16S rRNA 基因克隆文库; B: *nirS* 基因克隆文库.

Note: A: 16S rRNA gene clone library; B: *nirS* gene clone library.

表2 16S rRNA 基因和 *nirS* 基因克隆文库的生物多样性和丰富度指数
Table 2 Biodiversity and predicted richness of 16S rRNA gene and *nirS* gene clone libraries

克隆文库 Clone library	克隆数 Number of clones	OTU 数 Number of OTUs	Simpson (<i>D</i>)	Shannon-Weiner (<i>H'</i>)	<i>S</i> _{Chao1}	<i>S</i> _{ACE}	覆盖率 Coverage
16S rRNA	86	53	0.02	3.74	140.9	163.1	0.56
<i>nirS</i>	190	60	0.05	3.47	128.6	144.7	0.81

从每个 OTU 中随机挑选一条序列, 在 GenBank 中分别寻找最相似序列以及来源于可培养微生物的最相似序列(表 3), 并且基于翻译后的氨基酸序列构建系统发育树(图 3)。

在 190 条有效序列中, 71.6% 可以归到 Proteobacteria 门(图 2B), 包括 Alpha、Beta 和 Gamma 纲。1.6% 的序列可以归到 Firmicutes 门 Bacilli 纲。剩下 26.8% 的序列尚无法确定属水平的分类地位。

nirS 基因克隆文库中, 有 6 个 OTU (占克隆子总数的 5.8%) 属于 Alphaproteobacteria, 它们与 GenBank 中的最相似的 *nirS* 基因序列有 88%–99% 的相似性。这些最相似序列大多来自相似的环境, 如中国珠江河口、旧金山湾河口^[22]、日本霞浦湖、中国长江河口^[18]、阿拉伯海海岸及以色列加利利海。Betaproteobacteria 纲是 *nirS* 基因克隆文库中最优势的类群, 占克隆子总数的 49.0%, 有 21 个 OTU 属于这个类群。克隆文库中丰度最高的 OTU (OTU2)

属于 Betaproteobacteria 纲, 包括了 36 条序列, 与 GenBank 中的一株已培养的反硝化菌 *Thauera* sp. R-26906 (CAK95700.1) 具有 100% 的序列相似性^[23]。丰度第四高 OTU 是 OTU24, 包括 10 条序列, 占克隆子总数的 5.3%, 其最相似序列来自于我国珠江河口区。这个类群中其余的大部分序列的最相似序列也都来源于海洋、河口、湖泊环境, 如九龙江河口区、中国武汉东湖^[24]、中国海河、波罗的海、美国切萨皮克湾等。有些序列的最相似序列来源于较独特的环境, 如城市污水处理厂、城市固体废物处理反应器^[25]等, 可能是由于它们所属的微生物对于氮代谢物具有一定降解能力。

有 14 个 OTU 属于 Gammaproteobacteria 纲, 占克隆子总数的 16.9%, 其中包括了本克隆文库中丰度为第二高的 OTU6。该 OTU 占克隆子总数的 6.3%, 与 GenBank 中来自于我国珠江口的序列 (AEK77803.1) 具有 99% 的序列相似性。这个类群中

表 3 NirS 序列相似性比对
Table 3 Comparison of the NirS sequences

OTU编号 OTU No.	含序列数 Number of sequences	序列号 Accession No.	来源于可培养微生物的最相似序列(序列号) Closest cultured relative (accession No.)	相似性 Identity (%)
OTU1	8	JX660492	Bacterium symbiont of <i>Nonionella stella</i> (AFM76975.1)	83
OTU2	36	JX660493	<i>Thauera</i> sp. R-26906 (CAK95700.1)	100
OTU3	6	JX660494	<i>Anaerolinea thermophila</i> UNI-1 (BAJ64797.1)	78
OTU4	2	JX660495	<i>Paracoccus</i> sp. R-28239 (CAJ76808.1)	82
OTU5	1	JX660496	<i>Cupriavidus pauculus</i> (ADN28072.1)	83
OTU6	12	JX660499	<i>Thiothrix</i> sp. AS (AGO45492.1)	81
OTU7	12	JX660500	Bacterium symbiont of <i>Nonionella stella</i> (AFM76975.1)	76
OTU8	5	JX660502	<i>Azoarcus</i> sp. UNPF34a (BAL52284.1)	76
OTU9	1	JX660504	<i>Anaerolinea thermophila</i> UNI-1 (BAJ64797.1)	75
OTU10	1	JX660549	<i>Thiothrix</i> sp. AS (AGO45492.1)	85
OTU11	3	JX660507	<i>Cupriavidus</i> sp. TSA25(BAI67036.1)	80
OTU12	1	JX660508	<i>Thiothrix</i> sp. AS(AGO45492.1)	78
OTU13	4	JX660509	<i>Ralstonia</i> sp. UNPF19a (BAL52290.1)	100
OTU14	2	JX660512	<i>Labrenzia aggregate</i> (EAV41893.1)	81
OTU15	2	JX660513	<i>Bacillus cereus</i> (AEO89629.1)	84
OTU16	1	JX660514	<i>Bacillus cereus</i> (ABD94583.1)	85
OTU17	2	JX660516	<i>Cupriavidus</i> sp. TSA23 (BAI67035.1)	83
OTU18	4	JX660520	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28451 (CAJ76755.1)	89
OTU19	1	JX660522	<i>Anaerolinea thermophila</i> UNI-1 (BAJ64797.1)	78
OTU20	2	JX660525	<i>Cupriavidus</i> sp. TSA25 (BAI67036.1)	75
OTU21	2	JX660526	<i>Thiothrix</i> sp. AS (AGO45492.1)	80
OTU22	1	JX660527	<i>Thiothrix</i> sp. AS (AGO45492.1)	79
OTU23	1	JX660534	<i>Caenispirillum salinarum</i> (WP_009542118)	62
OTU24	10	JX660536	<i>Rhodocyclales bacterium</i> UNPF16 (BAL52292.1)	72
OTU25	7	JX660537	Bacterium symbiont of <i>Nonionella stella</i> (AFM76975.1)	90
OTU26	6	JX660545	<i>Thiothrix</i> sp. AS (AGO45492.1)	80
OTU27	3	JX660547	<i>Azoarcus</i> sp. UNPF34a (BAL52284.1)	79
OTU28	7	JX660548	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28451 (CAJ76755.1)	94
OTU29	2	JX660553	Bacterium symbiont of <i>Nonionella stella</i> (AFM76975.1)	76
OTU30	1	JX660554	<i>Zoogloea</i> sp. UNPF36 (BAL52297.1)	75
OTU31	8	JX660556	<i>Herbaspirillum</i> sp. TSO46-2 (ABA18615.1)	79
OTU32	1	JX660559	<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396 (ABC31120.1)	79
OTU33	6	JX660562	<i>Ralstonia</i> sp. UNPF19a (BAL52290.1)	70
OTU34	1	JX660563	<i>Cupriavidus</i> sp. TSA25 (ABA18615.1)	76
OTU35	1	JX660565	<i>Anaerolinea thermophila</i> UNI-1 (BAJ64797.1)	78

(待续)

(续表)

OTU36	1	JX660576	<i>Hahella ganghwensis</i> (WP_020408328.1)	78
OTU37	2	JX660582	<i>Herbaspirillum</i> sp. TSO23-1 (BAJ11544.1)	85
OTU38	1	JX660593	Burkholderiaceae bacterium N52 (BAH90677.1)	85
OTU39	1	JX660595	<i>Thiothrix caldifontis</i> (ABD94583.1)	79
OTU40	1	JX660600	Alpha proteobacterium 4N (AFX65532.1)	90
OTU41	1	JX660610	<i>Thiothrix</i> sp. AS (AGO45492.1)	85
OTU42	1	JX660612	<i>Comamonas</i> sp. R-28227 (CAJ76756.1)	78
OTU50	1	JX660646	<i>Marinobacter</i> sp. CG157051 (ABG36515.1)	72
OTU51	1	JX660647	<i>Azoarcus</i> sp. UNPF34a (BAL52284.1)	77
OTU52	1	JX660655	<i>Comamonas</i> sp. R-28227 (CAJ76756.1)	78
OTU53	1	JX660657	<i>Thiothrix eikelboomii</i> (AGO45493.1)	80
OTU54	1	JX660661	<i>Anaerolinea thermophila</i> UNI-1 (BAJ64797.1)	74
OTU55	1	JX660664	<i>Rhodanobacter</i> sp. D206a (BAI67028.1)	79
OTU56	1	JX660672	<i>Azospirillum</i> sp. TSO28-1 (BAJ11547.1)	77
OTU57	1	JX660680	<i>Pseudomonas grimontii</i> (ABF65969.1)	66
OTU58	1	JX660681	<i>Polymorphum gilvum</i> (WP_013651333)	49
OTU59	1	JX660682	<i>Ralstonia</i> sp. UNPF19a (BAL52290.1)	65
OTU60	1	JX660683	<i>Anaerolinea thermophila</i> (WP_013561145.1)	48

其它序列的最相似序列则来源于旧金山湾河口区^[22]、中国胶州湾河口区^[26]和渤海湾, 序列相似度在 85% 到 100%之间。

只有 2 个 OTU (包含 3 条序列)属于 Firmicutes 门 Bacilli 纲。其中两条序列来源于可培养微生物的最相似序列是在市政污水处理系统中分离获得的 *Bacillus cereus* (AEO89629.1)。克隆文库中剩余的 26.8%序列通过本方法无法对其属水平的分类地位作明确定位。

3 讨论

通过 16S rRNA 基因克隆文库的构建, 我们对九龙江河口区的微生物群落结构有了初步的整体认识, 该文库展现了较大的多样性。近年来有研究表明, 由于 16S rRNA 基因在原核生物内往往存在多个拷贝, 且各拷贝之间的基因序列并不完全相同, 因此, 基于 16S rRNA 基因, 尤其是基于其 V6 区的菌群多样性研究可能引起一定程度的高估^[27]。本研究中以 27f 为引物测序一个反应, 获得约 850 bp 的

序列片段, 由于序列长度较长, 基本覆盖 V1-V6 区, 因此能较大程度的降低这一高估的影响。

在 16S rRNA 基因克隆文库中, Proteobacteria 门(包括 Alpha、Beta、Gamma 和 Delta 纲), Actinobacteria 门 Actinobacteria 纲, Bacteroidetes 门 Flavobacteriia 纲和 Firmicutes 门 Bacilli 纲是其中最主要的类群。文献[10]中报道的另一采样自相同流域(九龙江)相同季节(冬季)且地理环境相似(河口)的水样中 16S rRNA 基因的 DGGE 分析结果表明, 其优势条带割胶测序结果为 Firmicutes 门、Proteobacteria 门 Alpha 纲和 Bacteroidetes 门 Flavobacteriia 纲, 这与本研究结果相吻合; 而对比该文献报道的与本研究采样自相同流域(九龙江)相同季节(冬季)、但不同地理环境(九龙江中游)的主要细菌类群发现, 两者基本吻合, 唯一的区别在于后者样品中检出 Cyanobacteria 而本研究样品中没有, 说明该类细菌的分布与地理环境有关。而其他文献报道的类似地理环境(切萨皮克湾)相同季节(冬季)

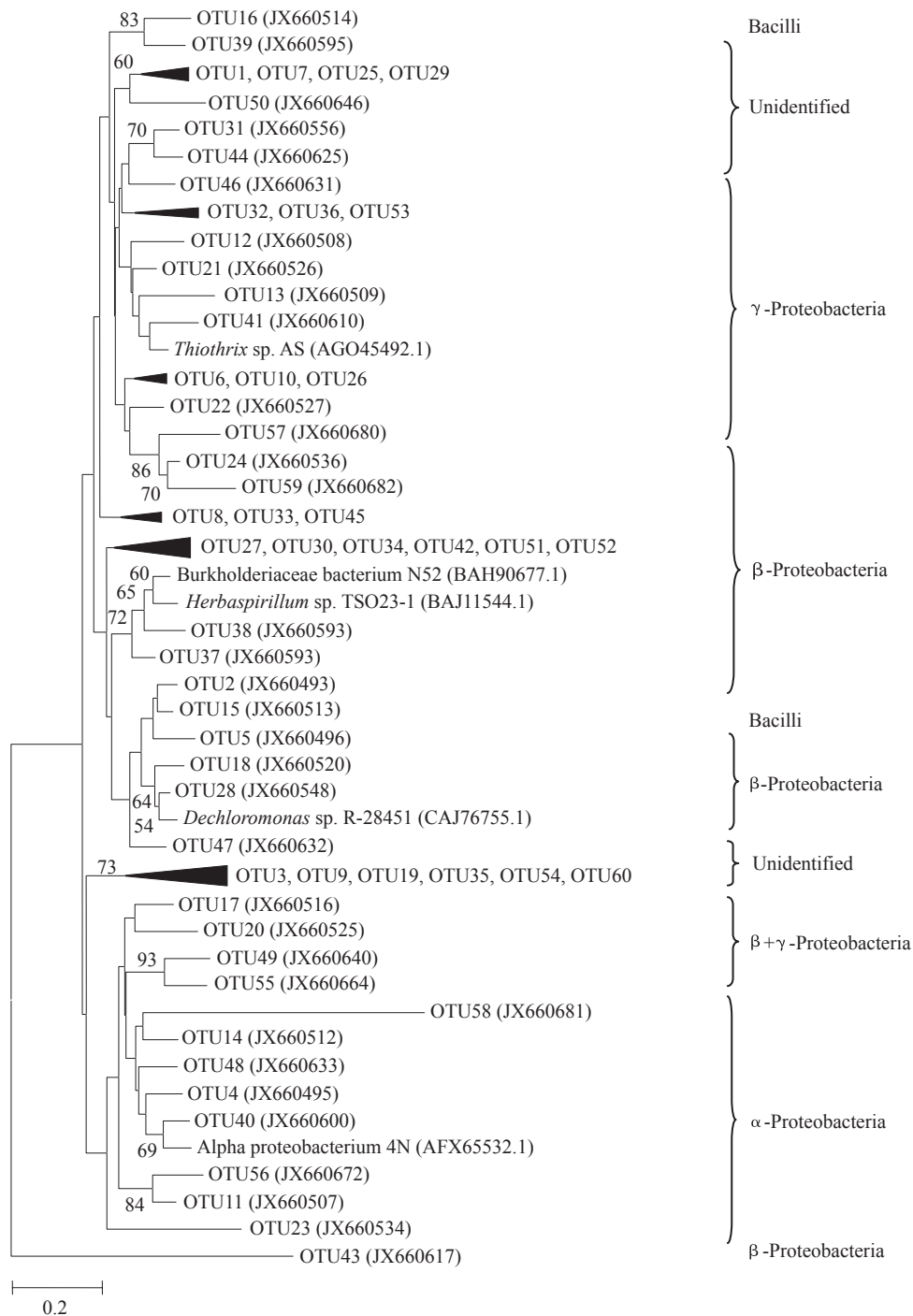


图3 NirS 序列系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on translated *nirS* sequences

注：以 82% 的序列相似性划分 OTU，每个 OTU 随机挑选一条代表序列用于构建 NirS 序列系统发育树。在树节上的数字代表 1 000 取样的百分比，仅显示大于 50% 的情况。

Note: Phylogenetic tree was constructed based on translated *nirS* sequences of the representatives of each OTU at 18% cut off. Bootstrap values above 50% of for 1 000 replicates are shown at branch points.

的主要细菌类群^[28-29]中也没有发现 *Cyanobacteria*, 也印证了这一点。但切萨皮克湾夏季的细菌类群中 *Cyanobacteria* 却占到了克隆子总数的 9.4%, 说明该菌落的出现与季节相关。

在本研究中, *Proteobacteria* 门占克隆子总数的 62.9%, 相似的是, 有文献报道 *Proteobacteria* 门在丰度上占主要地位是河流环境中微生物菌群结构的特征之一^[30]。放线菌作为本研究中的第二大类群, 也经常被发现存在于河流湖泊的浮游微生物中^[31], 这可能是由于这个类群能够产生抗生素以抵抗原生生物的入侵^[32-33]。

16S rRNA 基因克隆文库中, 有 7 个克隆(占克隆子总数的 10.5%)分属于 *Marinobacterium*、*Rhodopirellula*、*Ralstonia*、*Comamonas* 和 *Thiothrix* 5 个属。由于我们在 *nirS* 基因克隆文库中也检测到相同类群的微生物, 因此推测它们可能属于反硝化细菌。其中 *Marinobacterium* 属微生物占 16S rRNA 基因克隆子总数的 4.7%, 其序列最相似菌 *Marinobacterium litorale* IMCC1877 (DQ917760)最初从韩国德积岛海岸附近的表层海水中分离得到, 而在黑海低氧浓度区域也有分离到该属的反硝化细菌^[34]。*Rhodopirellula* 属微生物占克隆子总数的 2.3%, 其序列最相似菌 *Rhodopirellula baltica* SH 1 (NR_043384.1)分离于波罗的海西南部基尔湾的水域中, 它曾被报道具有厌氧氨氧化能力。*Ralstonia* 属微生物的序列最相似菌 *Ralstonia pickettii* ATCC 27511 (NR_043152.1)本身并未被报道具有反硝化能力, 它存在于潮湿环境中, 常引起人类感染, 但在另一关于九龙江流域潜在病原菌污染分析的研究中并未被检测到^[11], 而 *Ralstonia* 属的其它细菌则曾被报道具有反硝化基因^[35]。*Comamonas* 属和 *Thiothrix* 属的序列最相似菌 *Comamonas testosteroni* KS 0043 (NR_029161.1)和 *Thiothrix disciformis* B3-1 (NR_024756.1)虽然都未见被直接报道具备反硝化能力, 但在过去的研究中这两个属都已发现许多反硝化菌^[36-37]。考虑到本研究中采样点水体高浓度氮

素的存在, 在 16S rRNA 文库中检测到多个类群的反硝化细菌的研究结果也印证了之前关于环境中氨氮、硝氮和亚硝氮浓度是影响细菌群落结构的重要因素的说法^[38]。

河口区是将人类活动产生的氮素从陆地向海洋转移的主要渠道。同时, 河口区超过 50%的无机氮通过微生物的反硝化作用转化为氮气形式释放^[21]。由于其淡水与海水混合的盐度特征以及潮汐交替等特点, 河口区形成了其独特的生境。本研究中, *nirS* 基因克隆文库中有 82 条序列(占克隆子总数的 43.2%)的最相似序列都来源于珠江河口区; 并且文库中的大多数序列都与 GenBank 中来自于河口、海湾等环境的序列有着很高的序列相似性。这与过去的研究相似^[39], 表明虽然不同样品间的地理位置差异巨大, 但生境是决定反硝化菌群的结构差异的最主要因素。

与我国武汉东湖^[24]以及青岛胶州湾^[26]的 *nirS* 基因克隆文库相比, 九龙江河口区 *nirS* 基因克隆文库的多样性和丰富度更高。同时, 本研究中的九龙江河口区由于农业施肥及畜牧业粪便的过度排放, 造成了水体中高浓度的氨氮、硝氮和亚硝氮积累, 其浓度也高于武汉东湖和青岛胶州湾。此外, 如上文所述, 本研究中 *nirS* 基因克隆文库中很多序列在 GenBank 中的最相似序列都来源于我国珠江口和长江口等氮含量较高的水域。这说明反硝化菌群的结构和多样性很可能与环境中的含氮化合物的含量有着密切关系^[40]。

大部分 *NirS* 序列可以归到 *Proteobacteria* 门, 其中 *Betaproteobacteria* 纲是最优势的类群。这之前所报道的大量反硝化菌属于 *Betaproteobacteria* 纲相吻合^[41-43]。文库中有些序列来源于可培养微生物的最相似序列属于 *Thauera* 属(19.5%)、*Paracoccus* 属(1.1%)、*Bacillus* 属(1.6%)、*Thiothrix* 属(14.2%), *Comamonas* 属(1.1%)和 *Azoarcus* 属(5.3%), 其他文献中也常有在这些属中发现反硝化细菌的报道^[44-47]。而 *nirS* 基因克隆文库中的 *Marinobacterium*、

Rhodopirellula、*Ralstonia*、*Comamonas* 和 *Thiothrix* 5 个属在 16S rRNA 基因克隆文库中也有检出, 说明它们可能在水体样品中也具有较高的丰度。

本研究中 *nirS* 基因克隆文库丰度最高的 OTU2 (包含 36 条序列, 占克隆子总数的 19.0%) 在 GenBank 中的最相似序列为一株可培养的反硝化菌 *Thauera* sp. R-26906 (CAK95700.1)^[23]。在过去的研究中 *Thauera* 属的微生物已被证实具有在反硝化条件下降解多种污染物, 尤其是多环芳香族化合物的能力^[34]。因此 *Thauera* 属的微生物在反硝化过程中发挥重要作用, 并经常在废水处理系统中被发现。采样点水样中高浓度的含氮量以及可能存在的多环芳香族化合物的污染^[19]也为 *Thauera* 属在本文库中的优势地位提供了合理解释。

值得注意的是, 并非所有 NirS 序列的最相似序列都来源于反硝化细菌。*nirS* 基因克隆文库中的 OTU1、OTU7、OTU25 和 OTU29 共 4 个 OTU (包括 29 条序列, 占克隆子总数的 15.3%) 的最相似序列是有孔虫的共生微生物的 NirS 序列 *Bacterium symbiont of Nonionella stella* (AFM76975.1)。近来有文献报道它能够完成从硝酸盐到氮气的完整反硝化过程^[48]。

NirS 序列的多样性以及那些与已知序列相似度很低的序列, 表明九龙江河口区具有丰富的、未知的亚硝酸盐还原酶多样性, 其具体状况还有待进一步发掘。河口区由于经常受到人类活动的影响, 富含各种营养成分和污染物, 并且受到海水和淡水水流的混合, 使其具有独特的微生物群落结构, 并包含丰富的未知遗传学和生态学信息。本研究初步揭示了九龙江河口区微生物菌群, 尤其是 *nirS* 型反硝化细菌群落结构的多样性, 将有助于进一步开展含氮化合物污染的富营养化水体的修复研究。

参 考 文 献

- [1] Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. Microbiology and Molecular Biology Review, 1997, 61(4): 533-616
- [2] Berk BC, Ferguson SJ, Moir JW, et al. Enzyme and associated electron transport systems that catalyze the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1232(3): 97-173
- [3] Glockner AB, Jüngst A, Zumft WG. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd1-free background (NirS-) of *Pseudomonas stutzeri*[J]. Archives of Microbiology, 1993, 160(1): 18-26
- [4] Nogales B, Timmis KN, Nedwell DB, et al. Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 5017-5025
- [5] Tamegai H, Aoki R, Arakawa S, et al. Molecular analysis of the nitrogen cycle in deep-sea microorganisms from the Nankai Trough: genes for nitrification and denitrification from deep-sea environmental DNA[J]. Extremophiles, 2007, 11(2): 269-275
- [6] Brettar I, Moore ER, Höfle MG. Phylogeny and abundance of novel denitrifying bacteria isolated from the water column of the Central Baltic sea[J]. Microbial Ecology, 2001, 42(3): 295-305
- [7] Park SY, Shimizu H, Adachi S, et al. Crystal structure of nitric oxide reductase from denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*[J]. Nature Structural Biology, 1997, 4(10): 827-832
- [8] Magalhães CM, Machado A, Matos P, et al. Impact of copper on the diversity, abundance and transcription of nitrite and nitrous oxide reductase genes in an urban European estuary[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 77(2): 274-284
- [9] Chen NW. Nitrogen sources and exports in Jiulong River watershed[D]. Xiamen: Doctoral Dissertation of University of Xiamen, 2006 (in Chinese)
- [10] 陈能汪. 九龙江流域氮的源汇过程及其机制[D]. 厦门: 厦门大学博士学位论文, 2006
- [10] Liu LM, Yang J, Zhang YY. Genetic diversity patterns of microbial communities in a subtropical riverine ecosystem (Jiulong River, southeast China)[J]. Hydrobiologia, 2011(678): 113-125
- [11] Hou LY, Hu AY, Ma Y, et al. Distribution of potential pathogenic bacteria in the Jiulong River watershed[J]. Acta Environmental Sciences, 2014, 35(5): 1743-1749 (in Chinese)
- [11] 侯丽媛, 胡安谊, 马英, 等. 九龙江流域潜在病原菌污染分析[J]. 环境科学, 2014, 35(5): 1743-1749
- [12] Li QQ, Wang FP, Chen ZW, et al. Stratified active archaeal communities in the sediments of Jiulong River estuary, China[J]. Frontier in Microbiology, 2012, 3(311): 1-14
- [13] Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985, 82(20): 6955-6959
- [14] Throbäck IN, Enwall K, Jarvis A, et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49(3): 401-417
- [15] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948
- [16] Schloss PD, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(3): 1501-1506
- [17] Dang H, Li T, Chen M, et al. Cross-ocean distribution of Rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(1): 52-60
- [18] Dang HY, Zhang XX, Sun J, et al. Diversity and spatial distribution of sediment ammonia-oxidizing Crenarchaeota in response to estuarine and environmental gradients in the Changjiang Estuary and East China Sea[J]. Microbiology, 2008, 154(Pt7): 2084-2095

- [19] Tian Y, Liu HJ, Zheng TL, et al. PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China[J]. Marine Pollution Bulletin, 2008, 57(6/12): 707-715
- [20] Palmer K, Drake HL, Horn MA. Genome-derived criteria for assigning environmental *narG* and *nosZ* sequences to operational taxonomic units of nitrate reducers[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(15): 5170-5174
- [21] Palmer K, Biasi C, Horn MA. Contrasting denitrifier communities relate to contrasting N₂O emission patterns from acidic peat soils in arctic tundra[J]. The ISME Journal, 2012, 6(5): 1058-1077
- [22] Mosier AC, Francis CA. Denitrifier abundance and activity across the San Francisco Bay estuary[J]. Environmental Microbiology Reports, 2010, 2(5): 667-676
- [23] Heylen K, Gevers D, Vanparys B, et al. The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(11): 2012-2021
- [24] Cheng ZB, Yang JK, Li H, et al. Phylogeny diversity of the nitrite reductase gene (*nirS*) in the sediments of the eutrophic East Lake, Wuhan[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(5): 667-675 (in Chinese)
程占冰, 杨江科, 李鹤, 等. 淡水富营养型湖泊沉积物亚硝酸还原酶基因(*nirS*)的多样性和系统发育[J]. 微生物学报, 2011, 51(5): 667-675
- [25] Hallin S, Throbäck IN, Dicksved J. Metabolic profiles and genetic diversity of denitrifying communities in activated sludge after addition of methanol or ethanol[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(2): 5445-5452
- [26] Dang H, Wang C, Li J, et al. Diversity and distribution of sediment *nirS*-encoding bacterial assemblages in response to environmental gradients in the eutrophied Jiaozhou Bay, China[J]. Microbial Ecology, 2009, 58(1): 161-169
- [27] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes over estimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969
- [28] Kan J, Suzuki MT, Wang K, et al. High temporal but low spatial heterogeneity of bacterioplankton in the Chesapeake Bay[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 6776-6789
- [29] Kan J, Evans SE, Chen F, et al. Novel estuarine bacterioplankton in rRNA operon libraries from the Chesapeake Bay[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2008, 51(1): 55-66
- [30] Zwart G, Crump BC, Kamst-van Agterveld MP, et al. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2002, 28(2): 141-155
- [31] Warnecke F, Amann R, Pernthaler J. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages[J]. Environmental Microbiology, 2004, 6(3): 242-253
- [32] Pernthaler J, Posch T, Simek K, et al. Predator-specific enrichment of Actinobacteria from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 2145-2155
- [33] Sahoo K, Dhal NK. Potential microbial diversity in mangrove ecosystems: a review[J]. Indian Journal of Marine Science, 2009, 38(2): 249-256
- [34] Oakley BB, Francis CA, Roberts KJ, et al. Analysis of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) genes and cultivation reveal depauperate community of denitrifying bacteria in the Black Sea suboxic zone[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(1), 118-130
- [35] Green SJ, Prakash O, Gihring TM, et al. Denitrifying bacteria isolated from terrestrial subsurface sediments exposed to mixed-waste contamination[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(10): 3244-3254
- [36] Hong X, Zhang XJ, Liu B, et al. Structural differentiation of bacterial communities in indole-degrading bioreactors under denitrifying and sulfate-reducing conditions[J]. Research in Microbiology, 2010, 161(8): 687-693
- [37] Trubitsyn IV, Belousova EV, Tutukina MN, et al. Expansion of ability of denitrification within the filamentous colorless sulfur bacteria of the genus *Thiothrix*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 358(1): 72-80
- [38] Sun Z, Li GP, Wang CW, et al. Community dynamics of prokaryotic and eukaryotic microbes in an estuary reservoir[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 6966
- [39] Falk S, Hannig M, Braker G, et al. *nirS*-containing denitrifier communities in the water column and sediment of the Baltic Sea[J]. Biogeosciences, 2006, 3(3): 697-727
- [40] Winter C, Hein T, Kavka G, et al. Longitudinal changes in the bacterial community composition of the Danube River: a whole-river approach[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(2): 421-431
- [41] Miura Y, Watanabe Y, Okabe S. Membrane biofouling in pilot-scale membrane bioreactors (MBRs) treating municipal wastewater: impact of biofilm formation[J]. Environmental Science and Technology, 2007, 41(2): 632-638
- [42] Nielsen JL, Nielsen PH. Enumeration of acetate-consuming bacteria by microautoradiography under oxygen and nitrate respiring conditions in activated sludge[J]. Water Research, 2002, 36(2): 421-428
- [43] Sofia A, Liu WT, Ong SL, et al. *In-situ* characterization of microbial community in an A/O submerged membrane bioreactor with nitrogen removal[J]. Water Science and Technology, 2004, 50(8): 41-48
- [44] Chayabutra C, Ju LK. Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(2): 493-498
- [45] Ozeki S, Baba I, Takaya N, et al. A novel C1-using denitrifier *Alcaligenes* sp. STC1 and its genes for copper-containing nitrite reductase and azurin[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2001, 65(5): 1206-1210
- [46] Joo HS, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 100(2): 184-191
- [47] Aday SS, Lee DJ, Lai JY. Enhanced biological denitrification of high concentration of nitrite with supplementary carbon source[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(3): 773-778
- [48] Piña-Ochoa E, Høgslund S, Geslin E, et al. Widespread occurrence of nitrate storage and denitrification among Foraminifera and Gromiida[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(3): 1148-1153