

研究报告

渤海湾湾口表层沉积物中的核心细菌群落结构及其对环境因子的响应

刘鹏远^{1,2,3} 陈庆彩¹ 胡晓珂^{1,2,3*}

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室 山东 烟台 264003)

(2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室 山东 青岛 266237)

(3. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要:【背景】近年来渤海湾环境恶化加重,影响了近海生态系统的可持续发展。微生物对环境的高度灵敏性使其能够迅速对环境的变更做出反应,在海洋能量流动与物质循环过程中发挥了无可替代的作用。【目的】为探讨渤海湾湾口沉积物中细菌群落分布特征及其对环境因子的响应,选取渤海湾湾口 21 个站位的表层沉积物样品进行探究。【方法】利用高通量测序技术(Illumina HiSeq 2500)对细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 高变区进行测序,并结合相关环境因子分析沉积物中细菌群落组成和空间分布特征,试图探究起驱动作用的主要环境因子。【结果】研究区域广泛存在的细菌类群包括:变形菌门(Proteobacteria)占 56.8%,酸杆菌门(Acidobacteria)占 8.9%,绿弯菌门(Chloroflexi)占 8.1%,拟杆菌门(Bacteroidetes)占 6.2%,其中 γ -变形菌纲(Gamma-proteobacteria)和 δ -变形菌纲(Delta-proteobacteria)为变形菌门中的优势类群。陆源有机物的输入使入海口及近岸处总有机碳(Total organic carbon, TOC)、总有机氮(Total organic nitrogen, TON)含量偏高,并向周围呈辐射状降低,低值位于渤海湾中部深水区域。通过冗余性分析(Redundancy analysis, RDA)发现在研究区域中环境因素对物种组成和群落结构具有显著影响,其中粒径($<4\ \mu\text{m}$)和有机氮的影响较大($P<0.05$)。【结论】渤海湾微生物物种丰富,与环境因素关系显著,人为因素对微生物多样性和群落结构组成具有重要的影响作用。

关键词: 渤海湾, 沉积物, 微生物群落, 16S rRNA 基因多样性

Foundation items: Science and Technology Service Network Program of Chinese Academy of Sciences (ZSYS-006); National Basic Research Program of China (2015CB453301)

***Corresponding author:** Tel: 86-535-2109127; E-mail: xkhu@yic.ac.cn

Received: May 08, 2018; **Accepted:** July 25, 2018; **Published online** (www.cnki.net): July 30, 2018

基金项目: 中科院科技服务网络计划(ZSYS-006); 国家重点基础研究发展规划(973 计划) (2015CB453301)

***通信作者:** Tel: 86-535-2109127; E-mail: xkhu@yic.ac.cn

收稿日期: 2018-05-08; **接受日期:** 2018-07-25; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-07-30

Structure characteristics of core bacterial communities in surface sediments and analysis on their responses to environmental factors in the inlet of Bohai Bay

LIU Peng-Yuan^{1,2,3} CHEN Qing-Cai¹ HU Xiao-Ke^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Coastal Biology and Bio-resource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China)

(2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao, Shandong 266237, China)

(3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Background] In recent years, the increasingly polluted environment of Bohai Bay has impacted the sustainability of offshore ecosystems. **[Objective]** To explore the distribution characteristics of bacterial communities in surface sediments and their response to environmental factors, we selected surface sediment samples from 21 stations for study. **[Methods]** We investigated the microbial community structure by sequencing the V3–V4 hypervariable regions of bacterial 16S rRNA gene using the Illumina HiSeq 2500. Bacterial community composition, spatial distribution characteristics and environmental factors were combined and analyzed in an attempt to understand the key interactions. **[Results]** The 16S rRNA gene clone library analysis indicated that the most common phyla that were widely distributed in the 21 sites were: Proteobacteria (56.8%), Acidobacteria (8.9%), Chloroflexi (8.1%), Bacteroidetes (6.2%). Moreover, γ -Proteobacteria and δ -Proteobacteria were the most dominant classes in Proteobacteria. Total organic carbon and total organic nitrogen content in the near shore sediments is high due to the input of anthropogenic materia and gradually decreased offshore. The most significant influence on species composition and community structure within the study area were found to be from particle size (content < 4 μ m) and organic nitrogen load. **[Conclusion]** The microbial diversity in the inlet of Bohai Bay is very high and is significantly related to a variety of environmental parameters. Human activities play an important role in structuring the microbial diversity, community structure and distribution.

Keywords: Bohai Bay, Sediment, Microbial community, 16S rRNA gene diversity

渤海湾是中国渤海的三大海湾之一, 是华北地区的海运枢纽和京津冀的海上门户。渤海湾地区人口稠密, 周围被天津、秦皇岛、唐山、东营等工业发达的城市环绕, 加上油田开采、近海养殖以及曹妃甸等工业区的发展给渤海湾地区带来了极大的生态压力。由于渤海湾是半封闭型内海, 污染物自净能力受到严重限制, 致使渤海湾目前已成为全国海洋环境受破坏较为严重的海域之一。海洋沉积物是微生物群落的优良居住场所之一, 微生物在海洋中参与元素循环并在海洋环境能量流动与物质循环中扮演了重要的角色^[1-3]。环境因子的改变直接或间接影响着沉积物中微生物群落多样性、生物量及群落结构^[4-6], 微生物群

落结构的稳定是生态系统的重要组成及基本生态功能实现的保障^[7], 也是生态功能强弱及周围环境变化的敏感指示^[8-12], 某些微生物的种类和数量可直接影响群落功能的完整性。因此研究特定环境的微生物群落结构和功能对调控目标区域微生物功能、解释微生物与其生境的联系具有重大意义^[13]。

目前研究者们对渤海湾的研究致力于沉积物性质^[14-15]、重金属^[16]和污染物^[17-18]分布特征以及底栖动物群落特征^[19]等, 对渤海湾微生物群落特征的研究主要集中在潮间带及入海口流域^[20-22]。渤海湾湾口是湾内与外海的连接纽带, 北岸有外海高盐水的注入, 南岸有黄河泥沙的大量涌入, 两股水流在湾口中部交汇^[23], 因此湾口处沉积物

性质、水文地貌特征、水动力条件、营养要素等自然条件复杂多变。但针对渤海湾湾口海域表层沉积物微生物群落的研究还相对匮乏,因此,本实验在渤海湾湾口区采集了 21 个站位的表层沉积物作为研究对象,通过高通量测序分析并结合相关环境因子,从地表径流和人为影响两个方面分析沉积物中的细菌群落组成,探讨海洋环境因素与沉积物微生物群落构成、分布与多样性的联系,进一步完善渤海沉积物中细菌群落结构的研究成果。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2013 年 10 月采集了渤海湾湾口的 21 个站位(图 1),按照地理空间的分布大致将 21 个站位划分成 3 个小区域:渤海湾湾口北部 7 个站位(BN1、BN2、BN3、BN4、BN5、BN6、BN7);渤海湾湾口中部 8 个站位(BM8、BM9、BM10、BM11、BM12、BM13、BM14、BM15);渤海湾湾口南部 6 个站位(BS16、BS17、BS18、BS19、BS20、BS21)。沉积物由箱式采样器打捞,收集 0–5 cm 表

层沉积物样品,混匀后用 5 mL 的冻存管分装并立即液氮速冻用于 DNA 的提取,另保存 300–500 g 样品在 -20°C 冰箱用于理化因子的测定。带回实验室的样品在冷冻干燥机中冷冻干燥 72 h,研钵研磨,存于自封袋中避光保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

PowerSoilTM DNA Isolation Kit, Mo Bio 公司; Phusion[®] High-Fidelity PCR Kit、Next[®] UltraTM DNA Library Prep Kit, New England Biolabs 公司。紫外分光光度计, Thermo Scientific 公司; Illumina HiSeq 2500 测序仪, Illumina 公司; 冷冻干燥机, Christ 公司; 激光粒度仪, Malvern Instruments 公司; 元素分析仪, Elmentar 公司; 连续流动分析仪, Seal 公司。

1.3 沉积物理化因子测定

(1) 粒径检测: 冷冻干燥后的样品过 2 mm 筛网去除大颗粒杂质,取出适量用激光粒度仪检测粒径的大小。

(2) 总碳氮检测: 冷冻干燥后的沉积物样品过 100 目筛网后称取 1 g 于 10 mL 棕色瓶中,每个样品

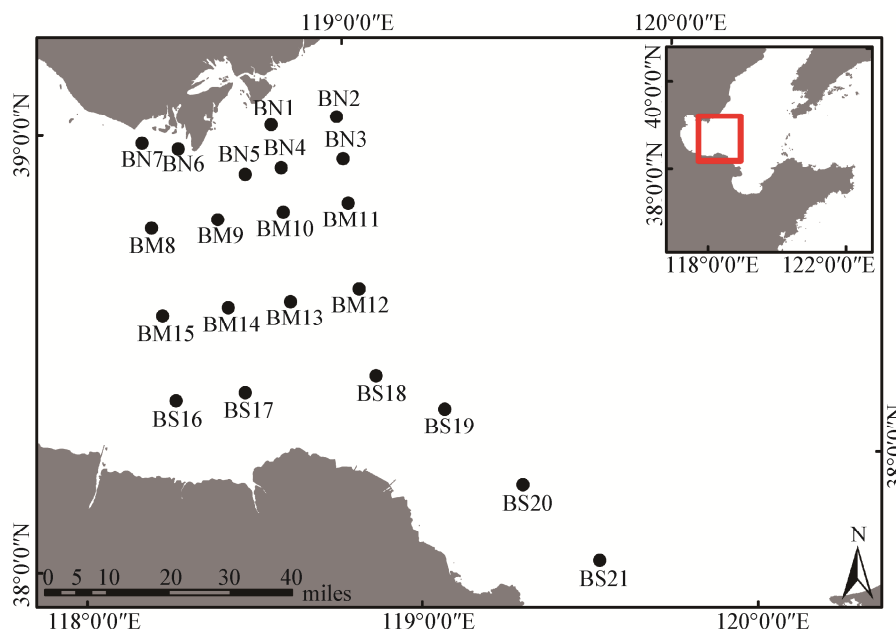


图 1 渤海湾湾口站位图

Figure 1 Distribution of sampling sites in the inlet of Bohai Bay

设置 3 个平行; 向棕色瓶中加入 1 mol/L 的盐酸 3 mL, 功率 300 W 下超声作用 1 h 使其充分混匀, 室温下放置 1 h; 用滴管吸出上清后再向棕色瓶中加入 1 mol/L 的盐酸直至无气泡产生, 超声 1 h 后室温放置 24 h; 用滴管吸出上清后加 3 mL 超纯水, 混匀后置于 60 °C 烘箱中烘干表层水, 再重复加水烘干, 直至上清液的 pH 呈中性为止; 烘干样品并利用元素分析仪测定。

(3) 三态氮检测: 样品经 100 目筛网过滤后称取 2.5 g 于 50 mL 的塑料瓶, 加入 2 mol/L 的 KCl 溶液 25 mL, 振荡 1 h 浸提; 用注射器吸取上清液, 过 0.45 μm 滤膜至 3 个 15 mL 离心管中(每个样品设置 3 个平行)并用连续流动分析仪进行测定。

1.4 基因组 DNA 的提取、PCR 扩增及高通量测序

21 个站位沉积物样品中的 DNA 提取采用的是 PowerSoil™ DNA Isolation Kit, 实验流程参照试剂盒说明书。DNA 纯度和浓度的检测在紫外分光光度计上完成。采用 Phusion® High-Fidelity PCR Kit 来 PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 高变区, 引物使用了带 6 个碱基的 Barcode 的正向引物 341F (5'-CCTACGGGNGBCASCAG-3')和反向引物 785R (5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3')^[24]。PCR 反应体系: 2×Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 15 μL , DNA 模板 100–200 ng, 正、反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , 用无菌双蒸水补齐到 30 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 25 个循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保存。PCR 产物经过电泳检测, 胶回收得到 PCR 产物使用 Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina 建库试剂盒构建文库。双末端测序使用 Illumina HiSeq 2500 平台, 测序工作在北京市计算中心生物计算事业部完成。

1.5 数据处理和多样性分析

2 381 737 条原始序列在 QIIME (V.1.8.0)^[25]和 Mothur (V.1.36)^[26]完成数据处理和分析。数据的质

控经历了严格的标准, 包括测序质量>20, 引物没有错配, 没有模糊碱基, 同聚体<7 等。数据库 Greengene (V.13.5)和 USEARCH V.61 软件被用来去除嵌合体。基于生成的 OTU 表, 利用 Mothur 分析样品的 α 多样性(包括 Chao1、Shannon 和 Simpson 指数等), β 多样性利用 Primer V6.0 (Primer-E Ltd.) 计算出的 Euclidean 距离和加权 Bray-Curtis 距离, 作 NMDS 图和样品聚类分析(Cluster)。

1.6 统计分析

利用 SPSS (V.16.0)统计软件进行 Pearson 相关性检验, 以 $P<0.05$ 作为差异显著水平; 群落结构与环境因子关系的分析使用了 CANOCO 4.5 及蒙特卡罗置换检验(Monte Carlo permutation test, permutation=999); 环境因子间的相关性分析由 R 软件(V.3.1.3)完成。

2 结果与分析

2.1 多样性指数分析

21 个样品的数据经过一系列的严格质控, 共获得了 2 094 757 条有效序列(表 1), 并且在 97%以上相似水平上划分出 231 014 个操作分类单元(Operational taxonomic units, OTUs)。覆盖度指数全部在 98.58%–99.43%, 说明测序结果可以较全面地反映调查区域环境微生物群落的真实情况。本文所有的原始序列已上传至 NCBI 数据库, 获得的序列号为 SRR7062257–SRR7062277。

Chao1 指数用来反映菌群丰富度, 指数越大说明物种总数越多; Shannon 和 Simpson 指数用来估算菌群多样性(Community diversity)。本实验 Chao1 指数的变化范围在 3 021.5–1 857.7, 指数最大的 3 个站位依次是 BN1、BN4、BN2, 所含物种数量最大; 而指数最低的 3 个站位是 BM8、BM12、BM11, 群落丰富度低。Shannon 指数和 Simpson 指数在 BM10、BN4、BN2 站位的值较高, 表明该处微生物多样性较高, 种群丰富并且分配均匀; 而 BM8、BS17、BM12 站位的值较小, 群落结构相对较为简单。3 个指数反映的趋势一致, 物种数量

表 1 渤海湾湾口沉积物样品的微生物 α 多样性指数

Table 1 Prokaryotic microbial alpha diversity index of sediment samples in the Bohai Bay inlet

样品 Samples	有效数列数 Valid sequences number	OTU 数 OTUs number	覆盖度 Coverage (%)	Chao1 index	Shannon index	Simpson index
BN1	111 839	15 051	0.995	3 021.498	6.179	0.989
BN2	125 892	15 077	0.997	3 008.172	6.385	0.993
BN3	131 942	13 095	0.997	2 886.009	6.211	0.992
BN4	96 550	12 732	0.996	3 010.410	6.387	0.993
BN5	129 365	13 199	0.997	2 959.388	6.271	0.992
BN6	124 310	11 934	0.996	2 875.796	5.986	0.990
BN7	123 852	12 368	0.996	2 871.744	5.976	0.989
BM8	58 397	5 805	0.988	1 857.659	5.234	0.979
BM9	89 024	11 045	0.994	2 987.891	6.259	0.991
BM10	74 915	11 273	0.992	2 934.017	6.444	0.995
BM11	66 895	9 102	0.990	2 462.277	6.030	0.992
BM12	41 685	6 288	0.986	2 185.645	5.866	0.990
BM13	106 000	11 536	0.996	2 970.029	6.176	0.991
BM14	87 754	9 479	0.994	2 850.593	6.138	0.989
BM15	115 317	10 385	0.997	2 841.268	6.047	0.987
BS16	118 329	10 328	0.996	2 728.175	5.964	0.988
BS17	117 601	8 924	0.996	2 589.900	5.787	0.986
BS18	83 622	9 800	0.994	2 793.421	6.061	0.989
BS19	86 966	10 659	0.995	2 855.383	6.142	0.990
BS20	110 943	12 174	0.996	2 833.793	6.134	0.989
BS21	93 559	10 760	0.994	2 777.472	5.913	0.980

越多的区域群落结构越复杂、均一性越高。微生物多样性呈现渤海湾湾口北环及近岸处高和中部低的趋势。

2.2 细菌群落分析

21 个站位的原核微生物 16S rRNA 基因测序结果与 Silva 数据库作比对且注释分类，共得到 23 门 55 纲 42 科 77 种，其中 7 个门为主要核心类群，约占到总体的 90.7%。渤海湾湾口南、中、北 3 个区域的物种组成差异显著($P=0.001$)。

从门水平上看，变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)是渤海湾湾口沉积物存在的主要核心细菌类群(图 2A)；此外，拟杆菌门(Bacteroidetes)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、放线菌门(Actinobacteria)、泉古菌门(Crenarchaeota)在所有站位中也广泛分布。

变形菌门的相对丰度高达 56.8%，为所有站位的优势菌群(BM8 优势菌门为绿弯菌门除外)，相对丰度较高的 3 个站位依次为 BS21 (64.6%)、BM13 (63.7%)、BM15 (63.4%)，相对丰度较低的 3 个站位为 BM8 (26.0%)、BM11 (35.95%)、BM12 (39.9%)，其空间分布特征为湾口中部比重显著低于南、北沿岸海域($P<0.005$ ； $P<0.005$)。变形菌门中丰富度较高的纲，主要有 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、 δ -变形菌纲(Deltaproteobacteria)、 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria) (图 2B)。其中 γ -变形菌纲相对丰度最高的 3 个站位是 BM14 (35.6%)、BS17 (34.8%)、BM15 (34.7%)，而最低的 3 个站位是 BM11 (6.0%)、BM8 (6.2%)、BM12 (7.1%)； δ -变形菌纲相对丰度最高的站位依次为 BN2 (31.2%)、BN3 (30.9%)、BN5 (30.0%)，丰度较低站位为 BS17 (16.4%)、BM8 (16.7%)、BM14 (19.6%)； α -变形菌

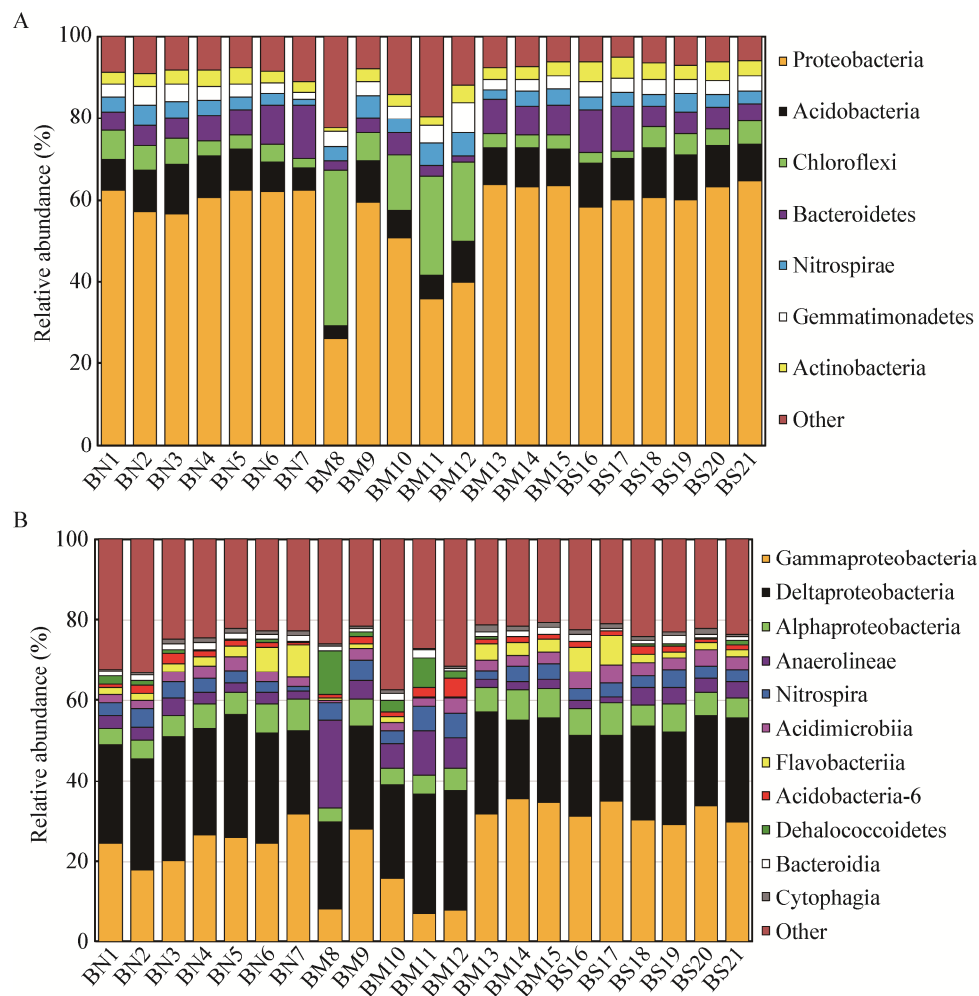


图 2 海湾湾口沉积物细菌群落结构差异

Figure 2 Differences in bacterial community in sediments of Bohai Bay inlet

注: A: 门水平上的群落组成; B: 纲水平上的群落组成. 丰度低于 1% 及无法准确匹配的物种归为 Other.

Note: A: Community composition base on phylum level; B: Community composition based on class level. Low relative abundance (<1%) species were classified as Other.

纲相对丰度最高站位是 BS17 (8.3%)、BN7 (8.2%)、BN6 (7.5%), 相对丰度最低的站位为 BM8 (2.7%)、BM11 (4.3%)、BN1 (4.3%)。

酸杆菌门占总丰度的 8.9%, 其中相对丰度较高的 3 个站位为 BN3 (12.1%)、BS18 (12.1%)、BS16 (10.7%), 相对丰度较低的 3 个站位是 BM8 (3.3%)、BM11 (5.6%)、BM10 (7.0%), 空间分布特征为渤海湾湾口南岸海域显著高于中部($P=0.04$)。

渤海湾湾口中部绿弯菌门的相对丰度超过酸杆菌门, 其中 BM8 站位绿弯菌门相对丰度(31.8%)

甚至超过变形菌门(26.0%)成为该站位的优势菌, 绿弯菌门相对丰度较高的 3 个站位依次为 BM8 (38.1%)、BM11 (24.5%)、BM12 (19.4%), 相对丰度较低的 3 个站位是 BS17 (1.7%)、BN7 (2.2%)、BS16 (2.9%), 空间分布特征为渤海湾湾口中部相对丰度显著高于南、北沿岸海区($P=0.04$; $P=0.04$)。厌氧绳菌纲(Anaerolineae)是绿弯菌门中的重要组成, 其相对丰度较高的站位为 BM8 (16.9%)、BM11 (9.5%)、BM10 (6.9%), 相对丰度较低的站位为 BS17 (1.3%)、BN7 (1.8%)、BS16 (1.9%)。

除以上核心菌外,拟杆菌门空间分布特征为渤海湾湾口西部海域大于东部,在 BN7 站位比例最高, BM12 站位比例最低,主要由黄杆菌纲(*Flavobacteriia*)组成。硝化螺旋菌门和芽单胞菌门的分布特征均与拟杆菌门相反,为渤海湾湾口东部海域相对丰度略高,并且比例都在 BM12 站位最高且 BN7 站位最低,在硝化螺旋菌门中含量最多的主要是硝化螺旋菌纲(*Nitrospira*)。放线菌门空间分布特征与变形菌门、酸杆菌门相似,最低丰度出现在渤海湾湾口中部区域,最高站位为 BS17,最低站位为 BM8,主要由酸微菌纲(*Acidimicrobiia*)组成。泉古菌门在渤海湾湾口中部相对丰度较高,在 BM8 站位高达 21.4%,仅次于绿弯菌门,成为第二优势菌类;在渤海湾湾口西南部海域泉古菌门的相对丰度低至 1%以下。

根据欧式距离(Euclidean distance)算法对物种进行非度量多维尺度分析(Non-metric multidimensional scaling, NMDS)(图 3),其胁迫系数(Stress)为 0.03 表明该图可以较好地展现样品间群落结构的相似性

程度。渤海湾湾口北部、中部与南部 3 个区域样品在二维的 NMDS 图上有较好的区分度和分布规律。根据站位聚类分析(图 4),发现渤海湾湾口北、中、南部海域沉积物样品与其他站位相比有明显区别,渤海湾湾口中部站位 BM8、BM10、BM11、BM12 相似性更大,结合渤海湾湾口沉积物主要细菌类型的相对丰度比较(表 2)得知,渤海湾湾口南、北海域细菌群落结构及相对丰度较为相似,只在 δ -变形菌纲、放线菌门的相对丰度上有显著差异;而南北沿岸与中部海域比较有显著差异的类群较多,包括: γ -变形菌纲、厌氧绳菌纲、*Dehalococcoidetes*、纤维粘网菌纲(*Cytophagia*),其中部海域中厌氧绳菌纲、*Dehalococcoidetes* 菌显著增多,并且 γ -变形菌纲、纤维粘网菌纲数量显著减少。

剩余各细菌类群在 21 个不同站位所占的 OTU 比例均很少,仅个别细菌类群空间分布上存在特异性。例如螺旋体门(*Spirochaetes*)只在渤海湾湾口中部数量较多,而其他站位比例均在 1%以下;蓝藻细菌(*Cyanobacteria*)只在 BN6 与 BN7 站位中比例高

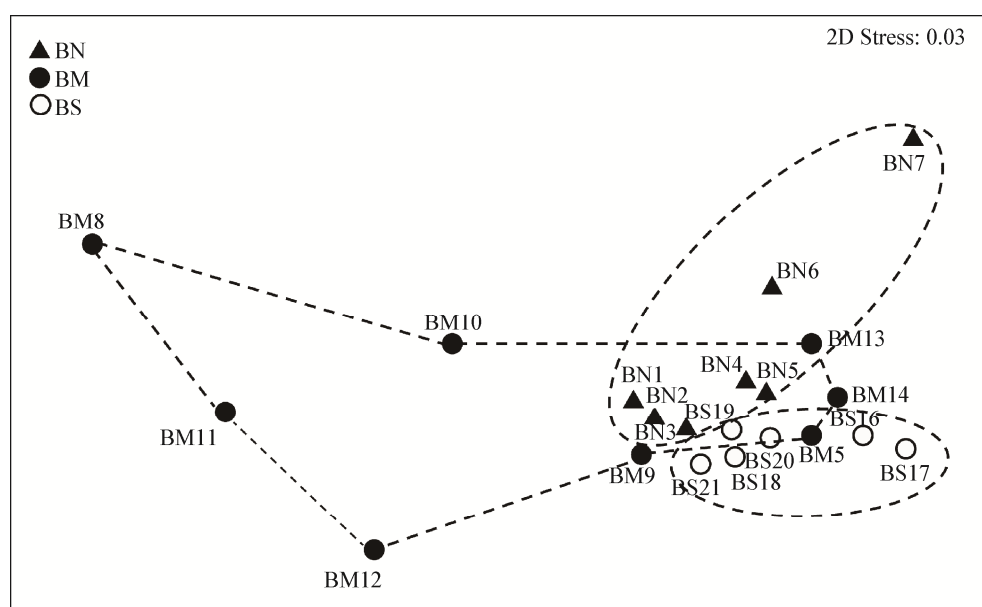


图 3 基于欧式距离的细菌群落非度量多维尺度排序

Figure 3 NMDS ordination based on Euclidean similarities of bacterial community structure

注:虚线指示渤海湾湾口北、中、南部区域的划分。

Note: Dashed lines indicate the northern, middle and southern of Bohai Bay inlet.

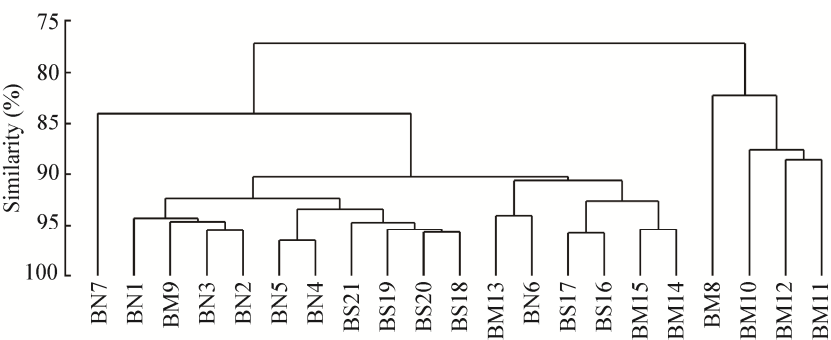


图 4 基于 Bray-Curtis 距离的站位聚类图
Figure 4 Plots of station cluster scaling based on Bray-Curtis distance

表 2 渤海湾湾口沉积物主要细菌类群的相对丰度(平均值±标准误, %)比较
Table 2 Comparisons of relative abundances (mean±SE, %) of major bacterial taxa in sediments of Bohai Bay inlet

Taxonomy	北沿岸 BN	南沿岸 BS	沿岸 BN+BS	中部 BM	BN vs. BM	BN vs. BS	BM vs. BS	BN+BS vs. BM
Proteobacteria	60.59±0.97	61.19±0.93	60.87±0.65	50.30±5.20	0.05*	0.91	0.05*	<0.01**
Gammaproteobacteria	25.51±1.67	31.47±0.93	28.26±1.28	20.84±4.63	0.31	0.23	0.04*	<0.01**
Deltaproteobacteria	28.12±1.32	21.93±1.35	25.26±1.27	23.33±1.33	0.02*	0.01**	0.47	0.47
Alphaproteobacteria	6.00±0.52	6.21±0.52	6.10±0.36	5.52±0.55	0.53	0.79	0.38	0.61
Acidobacteria	8.86±0.87	10.40±0.44	9.57±0.54	7.92±0.85	0.39	0.20	0.04*	0.36
Acidobacteria-6	1.48±0.27	1.36±0.11	1.43±0.15	1.70±0.38	0.60	0.78	0.44	0.24
Chloroflexi	4.79±0.69	4.05±0.68	4.45±0.48	13.94±4.48	0.04*	0.87	0.04*	<0.01**
Anaerolineae	3.07±0.34	3.21±0.53	3.13±0.29	6.44±1.78	0.06	0.94	0.08	0.01**
Dehalococcoidetes	0.97±0.29	0.38±0.17	0.70±0.19	2.71±1.11	0.11	0.61	0.05*	<0.01**
Bacteroidetes	7.07±1.21	7.00±1.25	7.04±0.83	4.85±0.96	0.17	0.97	0.20	0.76
Flavobacteriia	3.56±0.98	3.34±1.02	3.46±0.68	1.74±0.53	0.13	0.86	0.20	0.06
Bacteroidia	1.36±0.07	1.21±0.24	1.29±0.11	1.29±0.16	0.76	0.53	0.73	0.61
Cytophagia	1.03±0.07	0.95±0.09	1.00±0.06	0.84±0.15	0.24	0.64	0.51	0.01**
Nitrospirae	3.42±0.45	3.37±0.22	4.16±0.39	3.40±0.25	0.17	0.93	0.17	0.31
Nitrospira	3.42±0.45	3.37±0.22	4.16±0.39	3.40±0.25	0.17	0.93	0.17	0.31
Gemmatimonadetes	3.27±0.33	3.60±0.06	3.42±0.18	3.86±0.55	0.31	0.60	0.66	0.10
Actinobacteria	3.31±0.22	4.22±0.28	3.73±0.21	2.84±0.35	0.27	0.05*	0.01**	0.83
Acidimicrobiia	2.73±0.18	3.79±0.28	3.22±0.22	2.35±0.34	0.33	0.02*	<0.01**	0.74

注：*：差异显著($P\leq0.05$)；**：差异极显著($P\leq0.01$)。
Note: *: Significance at 0.05 level; **: Significance at 0.01 level.

于1%；浮霉菌门(Planctomycetes)只在 BM8 站位中未发现；迷踪菌门(Elusimicrobia)只发现于 BM8 站位等。

2.3 渤海湾湾口沉积物理化因子

渤海湾湾口南、中、北海域表层沉积物环境因子差异极显著($P=0.001$)，中部海域与南部和北部均显著不同($P=0.002$ ； $P=0.01$)。

沉积物粒径整体上呈现渤海湾湾口南北区域粒径偏大，而中部海域黏土含量居多(表 3)。BS21、BS20、BS19、BS18、BS17、BS16、BN5、BN4、BN3、BN2、BN1、BN6、BN7 站位离河流入海口较近，黄河、滦河在入海过程中携带了大量的泥沙，使得北部沙粒粒径($P<0.05$)显著大于中部，其中北部站位以粗砂为主要特征，南部

表 3 渤海湾湾口沉积物样品理化因子

Table 3 Physicochemical parameters of sediments collected from Bohai bay inlet

样品 Samples	粒径 Particle size (%)			深度 Depth (m)	温度 Temperature (°C)	有机碳 TOC (%)	有机氮 TON (%)	无机氮 Inorganic nitrogen		
	黏土 Clay ($<4\ \mu\text{m}$)	粉砂 Silt ($4\text{--}63\ \mu\text{m}$)	沙粒 Sand ($>63\ \mu\text{m}$)					NH ₄ ⁺ (mg/L)	NO ₂ ⁻ (μg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)
BN1	19.84	72.29	7.87	29.00	8.16	0.73	0.07	0.74	6.70	0.10
BN2	8.38	31.00	60.62	23.00	8.21	0.18	0.02	0.09	6.73	0.11
BN3	13.41	47.21	39.39	28.00	8.22	0.36	0.03	0.07	6.77	0.10
BN4	14.01	48.16	37.83	31.00	8.20	0.47	0.03	0.08	7.10	0.13
BN5	21.80	68.31	9.89	33.80	8.18	0.85	0.04	0.27	7.40	0.10
BN6	19.83	68.14	12.03	22.60	8.08	0.74	0.07	4.09	7.90	0.12
BN7	17.97	71.51	10.52	11.800	8.19	0.93	0.08	0.64	7.07	0.09
BM8	29.52	70.19	0.28	25.00	8.29	1.34	0.07	0.46	7.27	0.15
BM9	23.70	75.79	0.52	26.00	8.27	1.27	0.06	0.40	7.20	0.12
BM10	26.17	71.39	2.45	25.50	8.25	1.03	0.06	0.36	7.07	0.14
BM11	23.25	76.55	0.21	27.00	8.26	1.02	0.06	0.28	6.83	0.09
BM12	21.23	78.26	0.51	23.80	8.19	1.08	0.06	0.18	7.47	0.10
BM13	16.92	75.57	7.51	21.50	8.27	1.19	0.07	0.35	7.23	0.11
BM14	20.09	78.99	0.92	30.00	8.46	1.32	0.07	0.28	8.27	0.14
BM15	18.08	80.84	1.09	16.00	8.21	1.26	0.05	0.36	7.33	0.16
BS16	10.98	71.14	17.88	/	/	0.86	0.03	0.29	8.10	0.21
BS17	6.82	38.50	54.69	16.00	8.15	0.86	0.03	0.51	6.67	0.17
BS18	16.67	81.70	1.63	20.60	8.08	1.33	0.05	0.58	6.60	0.15
BS19	16.99	77.74	5.27	19.50	8.11	1.03	0.04	1.22	70.00	0.13
BS20	12.65	72.84	14.51	17.50	8.18	0.84	0.03	0.31	7.37	0.11
BS21	15.22	70.38	14.40	/	8.24	1.02	0.04	0.26	7.55	0.10

注：/：数据缺失。

Note: /: Missing data.

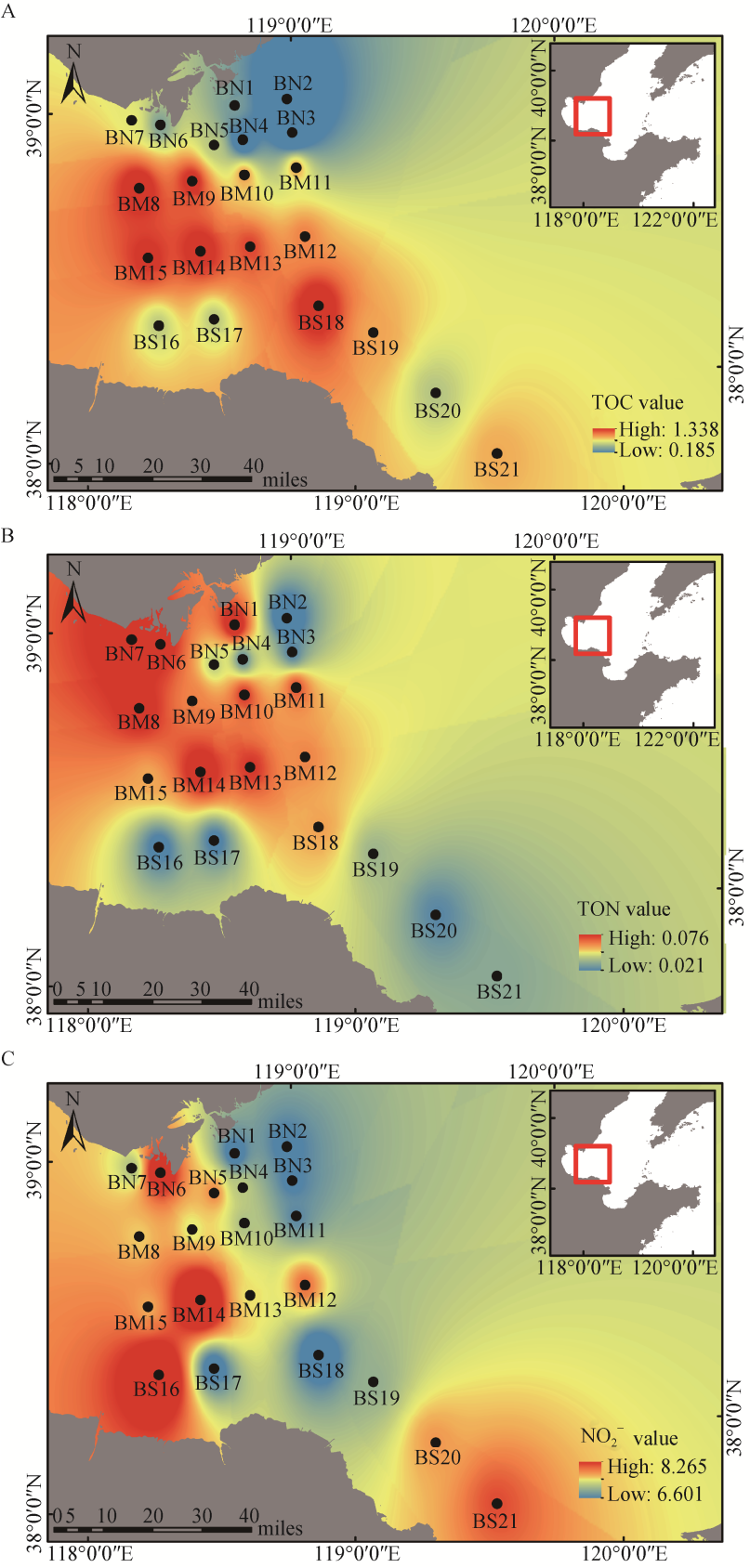
站位多为细砂粒和粉砂，中部海域站位小粒径颗粒极显著于南北环黏土数目($P<0.01$)。

渤海湾湾口北部 TOC 含量(图 5A)显著低于中南区域($P<0.01$)，最高的站位主要集中在 BM8 (1.34)、BS18 (1.33)、BM14 (1.32)、BM9 (1.27)、BM15 (1.26)处，分别位于渤海湾湾口中、南海域及黄河入海口处，并呈辐射状降低，在北部 BN2 (0.18)、BN3 (0.36)、BN1 (0.73)的含量达到最少。

本实验中 TON 含量(图 5B)最高的点主要在 BM7 (0.08)站位，其次为 BN8 (0.07)、BN6 (0.07)站位，其他站位含量较少，即渤海湾湾口 TON 含量的分布特征在西北部区域出现高值。研究表明 TON 是海洋沉积物中氮的主要存在形式(约占 62%)^[27]，而

沉积物中的无机氮分为 NO_2^- 、 NO_3^- 、 NH_4^+ 。由图 5C-E 可以看出 NO_2^- (6.60–8.27 $\mu\text{g/L}$)含量整体较少，仅有 BM14 (8.27)、BS16 (8.10)这 2 个站位的含量稍高； NO_3^- (0.09–0.21 mg/L)的含量在 BS16 站位附近含量较高，并呈放射状降低趋势； NH_4^+ (0.07–4.09 mg/L)的含量在渤海湾湾口入海口处的含量多于其他站位。因此渤海湾湾口沉积物各种形态氮元素含量呈现出近岸高于远岸，说明了陆源输入对海洋沉积物中氮元素含量及分布起着关键作用。

海洋环境中部分理化因子之间的变化具有一定的规律性和相关关系，这与海水中生物的活动密切相关^[28]。调查区域内 TOC 与黏土、粉砂、沙粒的相关系数分别为 0.57、0.80、-0.80 且相关性



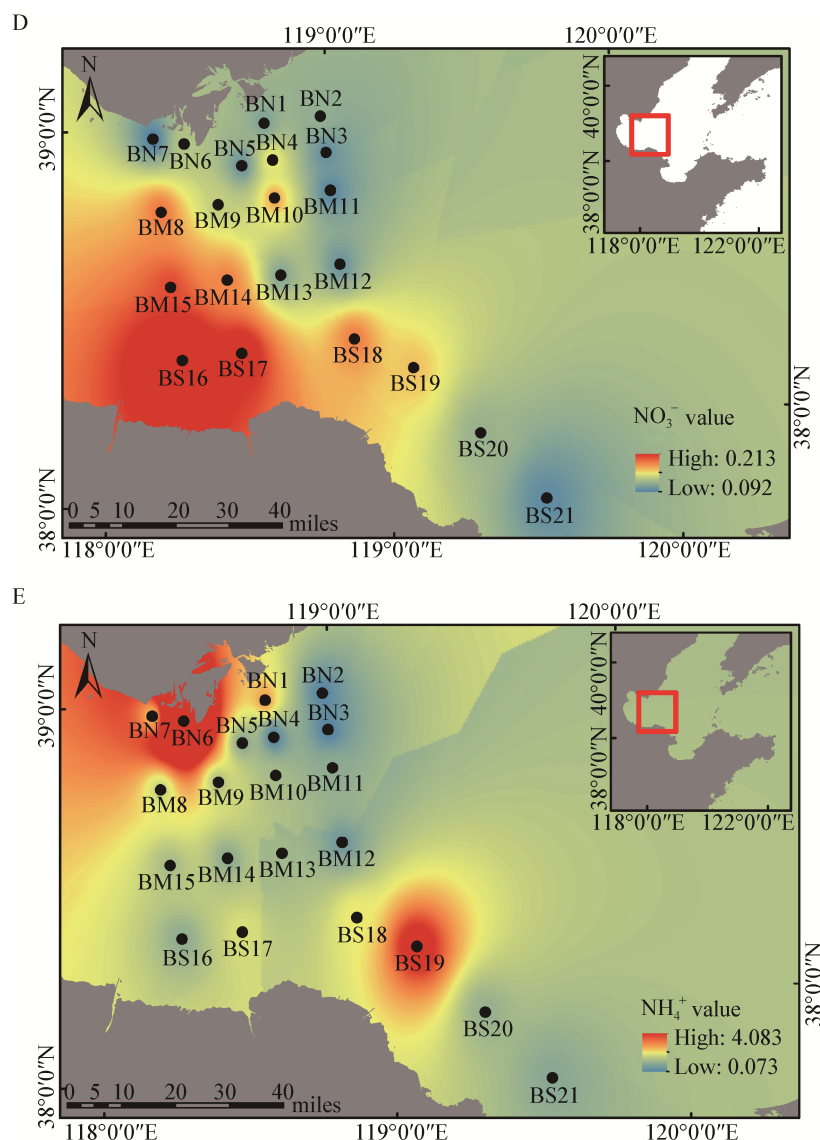


图5 环境因子等值线分布趋势图

Figure 5 Distribution trend of environmental factors

注: A: 有机碳; B: 有机氮; C: 亚硝态氮; D: 硝态氮; E: 氨态氮.

Note: A: TOC; B: TON; C: NO_2^- ; D: NO_3^- ; E: NH_4^+ .

极显著($P<0.01$)。TON 与黏土、 NO_3^- 、沙粒的相关系数分别为 0.73、0.61、-0.71, 并且显著相关($P<0.01$)。TOC 和 TON 的含量与沉积物的黏土、粉砂呈正相关, 而与沙粒呈负相关, 这与先前的报道结果一致^[29], TOC 和 TON 之间也显示出了显著的正相关性($P<0.01$), 其相关系数为 0.58。 NO_3^- 与 TON 的规律相似, 与黏土、粉砂、沙粒的相关系数分别为 1.00、0.61、-0.79, 其相关性都为极显著($P<0.01$); NO_3^- 与 TOC、TON 的相关系数分别为

0.57 ($P<0.01$)和 0.73 ($P<0.01$) (图 6)。

2.4 群落结构对环境因子的响应

在门分类水平上对 OTU 相对丰度作降趋势对应分析(Detrended correspondence analysis, DCA), 最大长度为 1.12, 因此选用了冗余性分析(Redundancy analysis, RDA)来探究菌群分布与环境因子之间的关系(图 7)。发现黏土、TON 两个环境因子与细菌群落结构的相关关系显著($P<0.05$), 而其他环境因素的影响作用较小。

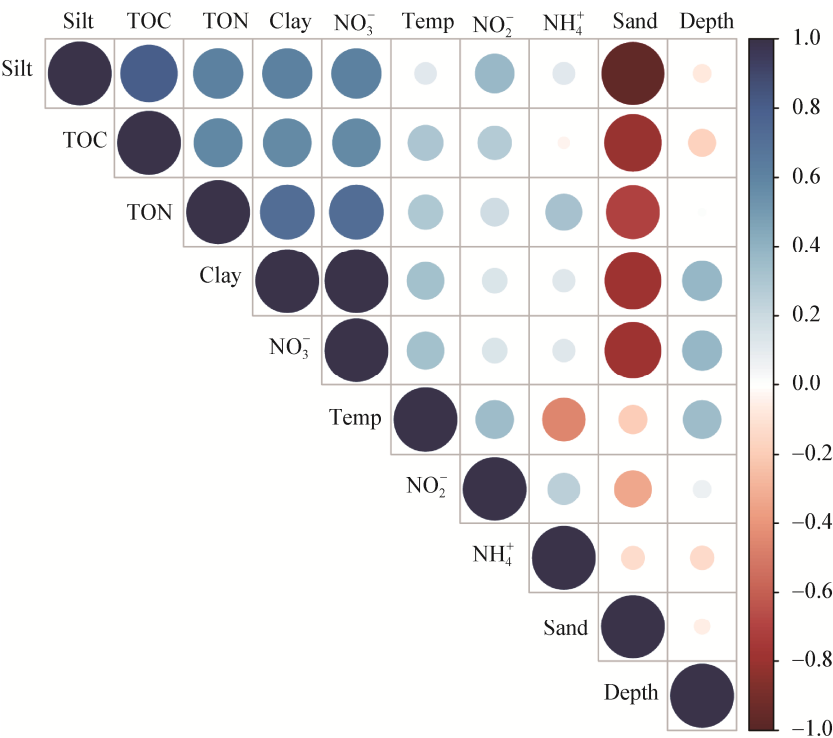


图 6 环境因子的相关性分析图
Figure 6 Correlation analysis of environmental factors

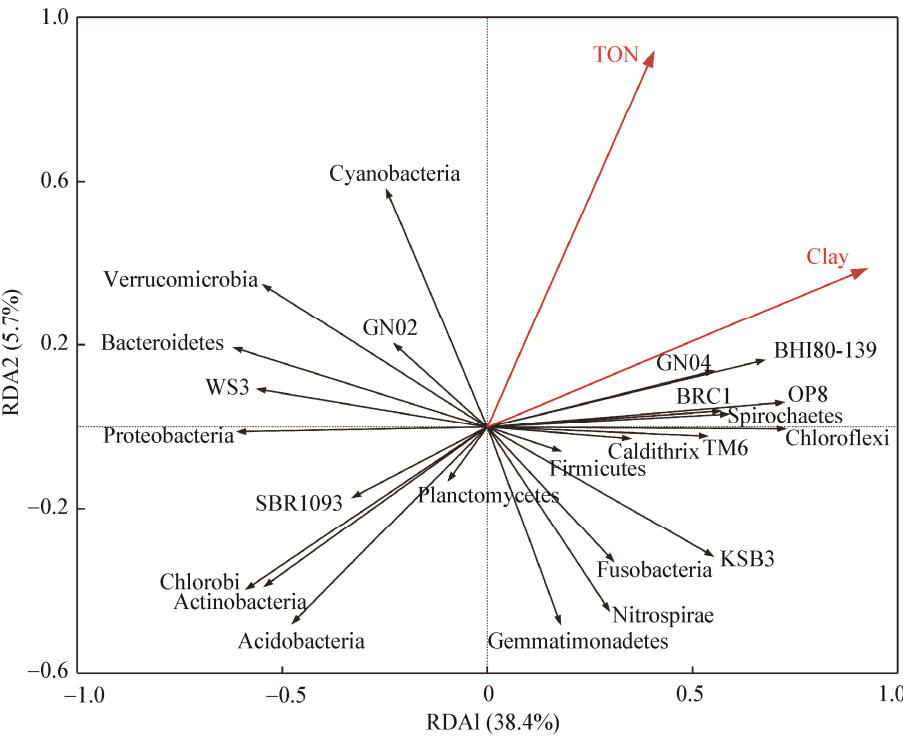


图 7 门水平上的冗余性分析
Figure 7 Redundancy analysis based on phylum level

绿弯菌门(Chloroflexi)、OP8、螺旋体门(Spirochaetes)、GN04、梭杆菌门(Fusobacteria)在渤海湾湾口中部的丰度相对较高,而且都与黏土含量呈正相关;变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、绿菌门(Chlorobi)在渤海湾湾口的空间分布特征为南北近岸海域相对丰度高于中部海域,而且都与黏土含量呈负相关。与TON含量呈负相关的微生物有酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、绿菌门(Chlorobi)。

3 讨论与结论

3.1 微生物群落多样性和时空分布差异

近海沉积物中细菌群落是海洋生态系统变化的灵敏指示计,而近年来由于受人为因素影响导致渤海环境恶化严重,引起了许多学者对黄渤海流域的关注和研究。刘欣等^[30]对胶州湾沉积物微生物进行了研究,发现胶州湾细菌含有14个门类,优势菌群为变形菌门的 γ -和 δ -变形菌纲,其次为拟杆菌门、浮霉菌门和放线菌门。姜会超等^[31]发现莱州湾沉积物中优势类群为变形菌门中的 α -和 γ -变形菌纲,其次为酸杆菌门、疣微菌门和浮霉菌门。白洁等^[32]对黄海西北部沉积物中细菌群落多样性的研究同样表明 γ -和 δ -变形菌纲为主要优势类群。本实验在渤海湾湾口沉积物中共发现23个细菌门类,优势菌为变形菌门的 γ -、 δ -和 α -变形菌纲,表明渤海湾湾口的细菌多样性与近海沉积物细菌多样性的总体规律一致^[33],并且微生物多样性高于渤海的其他海域。

γ -变形菌广泛分布于海洋环境中,参与有机物的降解与硫氧化过程,在厌氧条件下参与厌氧氨氧化作用^[34]; δ -变形菌在海洋中的功能多与硫酸盐相关; α -变形菌纲参与海洋中二甲基硫的转化,因此推测硫的生物地球化学循环对于渤海湾生态稳定具有关键作用。变形菌门中的 β -和 ε -变形菌纲在渤海湾湾口的所有站位里相对丰度都较低, β -变形菌是一类好氧和兼性厌氧类细菌,多出现在河口

等淡水或半咸水环境,因此相比其他站位距离河口较近的BN6、BN7中的 β -变形菌相对丰度较高;而 ε -变形菌纲多存在于人类与动物的消化道中,BS21站位临近黄河旅游生态景区,港口区域内人类活动明显,因此 ε -变形菌纲数量较高。

此外酸杆菌门、绿弯菌门、拟杆菌门、芽孢单菌门、硝化螺旋菌门等在渤海湾湾口各站位均有分布且站位间差异较大,揭示了环境对微生物的选择性,微生物多样性存在着空间分布差异。酸杆菌门多存在于重金属污染或酸性较强的环境^[35],而本实验中酸杆菌门的平均相对丰度达到8.9%,并且南北沿岸海域高于中部,暗示渤海湾湾口沿岸海域陆源污染情况不可忽视。绿弯菌门中含量较多的主要是厌氧绳菌纲,属于兼性厌氧细菌,并在产甲烷生态系统中降解碳水化合物和其他细胞材料如氨基酸等^[36]。实验发现拟杆菌门的成员主要为黄杆菌纲,多为严格好氧的化能异养细菌类群,能够降解生物大分子如纤维素、几丁质、DNA和琼脂,它们与浮游植物初级生产力(光合作用)高度相关,并且是海洋有机物矿化的主力军,在水生生态系统中具有重要的生态意义。而渤海湾湾口沿岸有机物含量高,沉积物表层的底栖动物扰动及海流流动提供了充足氧气,这些都促进了黄杆菌的增殖^[37]。硝化螺旋菌可以将亚硝酸盐氧化成硝酸盐对水生植物非常重要,由于受到黄河、海河及滦河带入的大量污染物影响及沿岸重工业造成的环境破坏,沉积物形成了不利于硝化螺旋菌生存的缺氧环境,造成渤海湾湾口近岸硝化螺旋菌数量的减少。

实验发现渤海湾湾口中部站位的菌群组成明显区别于沿岸站位,在中部海域厌氧绳菌纲、Dehalococcoidetes菌显著增多,同时 γ -变形菌纲、纤维粘网菌纲数量显著减少,可能是近岸的污染未能波及中部海域,营养结构相对近岸较为贫瘠。而渤海湾湾口沿岸由于工业发展、近海养殖、旅游业兴起及城市生活污水的排放导致有机物质含

量升高, 为多数微生物提供了充足养料, 造成近岸微生物多样性高于中部海域, 但同时也不能排除样品采集处理、测序的偏好性等因素所引入的误差。

3.2 环境因子分布特征

黄河每年平均携带约 1.1×10^9 t 泥沙进入海洋^[38], 沙粒在河流、海流的搬运和冲刷作用下向周围环境扩散并破碎成小的颗粒, 在适宜的条件下沉积于海底, 所以在深海处小粒径黏土含量显著, 而入海口及近岸区多为河流冲刷下来粒径较大的沙粒。

黄河入海不仅携带大量的泥沙, 还将有机物一起汇入渤海湾, 因此黄河入海口处的 TOC 含量最高, 并向周围呈梯度减少。而渤海西部临近重工业基地, 半封闭型海湾结构导致水质循环对流相对较差, 也会使有机质积累、含量增高。

由于BN6和BN7站位距离曹妃甸工业区较近, 滦河和海河陆源输入携带了大量 TON 进入渤海^[39], 所以 TON 含量在渤海湾湾口西北部出现最高值。在浮游动物、植物及细菌的共同作用下海洋氮循环中的 NO_2^- 、 NO_3^- 和 NH_4^+ 会进行相互转换, 并且当达到平衡时主要以 NO_3^- 的形式存在。实验选取站位中 NO_3^- 的浓度相对较高并在黄河入海口处出现高峰, 表明湾内无机氮浓度变化主要受陆源性因素的影响, 并且渤海湾湾口地区氮的转化达到平衡。

统计分析发现沉积物粒径与多种环境因子相关, TOC、TON、黏土和粉沙的含量有明显的正相关性, 而与沙粒含量有明显的负相关性。沉积物颗粒越小, 其表面积越大, 越能吸附糖类、蛋白质与氨基酸等物质, 并且粒径间彼此紧密结合不宜被外力破坏; 而粒度较大的颗粒与有机物结合后, 在水流搬运的过程中与周围颗粒摩擦脱落, 不利于有机质的保存。

3.3 群落结构对环境因子的响应

研究表明特定的环境更适合特定的菌群生存, 环境相似条件下菌群结构也较为相似^[40]。

有学者对油田周围海域的研究表明苯系物及总碳含量是研究区域表层沉积物中微生物群落结构的驱动者^[41]; Zheng 等^[22]在潮间带的研究表明沉积物的粒径和溶解氧是主要的环境驱动者; 而温度更被认为是重要的环境驱动者^[42-43]; 李友训^[44]对胶州湾微生物与环境因子相关性分析也发现不同环境因子对细菌具有选择作用, 并影响着胶州湾微生物群落结构的空间分布。

通过相关性分析, 我们发现渤海湾湾口沉积物黏土与 TON 含量对细菌具有显著驱动性。原因是沉积物粒径越小越有利于有机物质的保存与运输, 从而影响微生物营养物质的来源与摄取。

渤海湾北部站位临近曹妃甸工业区, 工业废水入海可能是 TON 含量在此处出现最高值的重要原因之一。之前的研究表明氮含量的增高会降低某些细菌的相对丰度, 例如 Fierer 等^[45]研究发现随着施氮量的增加, 农田里植被种类急剧减少的同时, 酸杆菌门的相对丰度降低; Ramirez 等^[46]发现氮量的增加会降低酸杆菌门和疣微菌门(Firmicute)的数量。本实验发现 TON 含量增高会导致酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、绿菌门(Chlorobi)数量的降低。

实验发现渤海湾湾口沉积物中微生物多样性较高的区域分别为黄河口及滦河口, 并以这 2 个区域为中心向外逐步降低, 这与刘欣等^[27]在胶州湾的研究显示近岸及湾口处沉积物中的细菌多样性要低于中部海域的结论相反。这些研究结果表明地表径流对渤海湾湾口沉积物中微生物群落结构起着不可忽视的调控作用: 河水径流及河口沿岸排污, 使得水体中携带大量有机物质利于微生物附着生长, 加之河口流域海水盐度低等因素均利于微生物的生长繁衍; 另外, 渤海湾与莱州湾生态环境、采样时间及温度等多方面原因都可能引起渤海湾湾口与胶州湾沉积物的细菌多样性差异。

3.4 结论

对渤海湾湾口 21 个站位表层沉积物群落结构及环境因子的分析得到以下结论: (1) 渤海湾 21 个站

位的主要细菌类群包括：变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。变形菌门中主要包括 γ -变形菌纲、 δ -变形菌纲、 α -变形菌纲，并且 γ -变形菌纲是优势菌群。(2) 研究区域中环境因子分布特征为：TOC 和 TON 浓度分布呈入海口及沿岸较高，并向周围逐渐降低的趋势，低值位于海湾中部深水区域。(3) TOC、TON 和 NO_3^- 含量与沉积物黏土、粉沙含量有明显的正相关性，与沙粒含量呈负相关性，并且 TOC 和 TON 之间呈显著的正相关。(4) 本研究发现沉积物的黏土特性和 TON 可能是影响渤海湾湾口沉积物细菌群落结构的主要驱动因子。

REFERENCES

- [1] Reysenbach AL, Gotz D, Yernool D. Microbial diversity of marine and terrestrial thermal springs[A]//Staley JT, Reysenbach AL. Biodiversity of Microbial Life[M]. New York: Wiley Liss, 2002: 345-421
- [2] O'Sullivan LA, Weightman AJ, Fry JC. New degenerate *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in River Taff epilithon[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(1): 201-210
- [3] Catania V, Santisi S, Signa G, et al. Intrinsic bioremediation potential of a chronically polluted marine coastal area[J]. Marine Pollution Bulletin, 2015, 99(1/2): 138-149
- [4] Smit E, Leeftang P, Wernars K. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1997, 23(3): 249-261
- [5] Kandeler F, Kampichler C, Horak O. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities[J]. Biology and Fertility of Soils, 1996, 23(3): 299-306
- [6] Kozdrój J, Van Elsas JD. Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling[J]. Applied Soil Ecology, 2001, 17(1): 31-42
- [7] Kim TY, Park SK, Cho SY, et al. Adsorption of heavy metals by brewery biomass[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2005, 22(1): 91-98
- [8] Sun MY, Dafforn KA, Brown MV, et al. Bacterial communities are sensitive indicators of contaminant stress[J]. Marine Pollution Bulletin, 2012, 64(5): 1029-1038
- [9] Ford T, Sorci J, Ika R, et al. Interactions between metals and microbial communities in New Bedford Harbor, Massachusetts[J]. Environmental Health Perspectives, 1998, 106 (suppl 4): 1033-1039
- [10] Powell SM, Bowman JP, Snape I, et al. Microbial community variation in pristine and polluted nearshore Antarctic sediments[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 45(2): 135-145
- [11] LaMontagne MG, Leifer I, Bergmann S, et al. Bacterial diversity in marine hydrocarbon seep sediments[J]. Environmental Microbiology, 2004, 6(8): 799-808
- [12] Yakimov MM, Denaro R, Genovese M, et al. Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(9): 1426-1441
- [13] Che YL, Wang H, Hu HY, et al. Research progresses on analytical technologies used in microbial community structure and diversity[J]. Ecology and Environment, 2005, 14(1): 127-133 (in Chinese)
车玉伶, 王慧, 胡洪营, 等. 微生物群落结构和多样性解析技术研究进展[J]. 生态环境, 2005, 14(1): 127-133
- [14] Meng W, Lei K, Zheng BH, et al. Modern sedimentation rates in the intertidal zone on the west coast of the Bohai Gulf[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2005, 24(3): 46-53
- [15] Lei K, Meng W, Zheng BH, et al. Grain size distributions of sediments in the intertidal zone on the west coast of the Bohai Bay[J]. Marine Science Bulletin, 2006, 25(1): 54-61 (in Chinese)
雷坤, 孟伟, 郑丙辉, 等. 渤海湾西岸潮间带沉积物粒度分布特征[J]. 海洋通报, 2006, 25(1): 54-61
- [16] Xu YY, Song JM, Li XG, et al. Variation characteristics and potential ecological risk assessment of heavy metals in the surface sediments of Bohai Bay[J]. Environmental Science, 2012, 33(3): 732-740 (in Chinese)
徐亚岩, 宋金明, 李学刚, 等. 渤海湾表层沉积物各形态重金属的分布特征与生态风险评价[J]. 环境科学, 2012, 33(3): 732-740
- [17] Zhang P, Song JM, Yuan HM. Persistent organic pollutant residues in the sediments and mollusks from the Bohai Sea coastal areas, North China: an overview[J]. Environment International, 2009, 35(3): 632-646
- [18] Ma M, Feng Z, Guan C, et al. DDT, PAH and PCB in sediments from the intertidal zone of the Bohai Sea and the Yellow Sea[J]. Marine Pollution Bulletin, 2001, 42(2): 132-136
- [19] Wang Y, Liu LS, Liu CQ, et al. Community structure characteristics of macrobenthos in the coastal seawaters of Bohai Bay in spring[J]. Research of Environmental Sciences, 2010, 23(4): 430-436 (in Chinese)
王瑜, 刘录三, 刘存歧, 等. 渤海湾近岸海域春季大型底栖动物群落特征[J]. 环境科学研究, 2010, 23(4): 430-436
- [20] Xiao H, Tang XX, Qiao XD, et al. The abundance of benthic bacteria in Tianjin nearshore waters in the Bohai Bay and its correlation with environmental factors[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(6): 87-90, 160 (in Chinese)
肖慧, 唐学玺, 乔旭东, 等. 渤海湾天津近岸表层沉积物中细菌丰度及其与环境因子的相关性研究[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(6): 87-90, 160
- [21] Wang LP, Liu LS, Zheng BH, et al. Analysis of the bacterial community in the two typical intertidal sediments of Bohai Bay, China by pyrosequencing[J]. Marine Pollution Bulletin, 2013, 72(1): 181-187
- [22] Zheng BH, Wang LP, Liu LS. Bacterial community structure and its regulating factors in the intertidal sediment along the Liaodong Bay of Bohai Sea, China[J]. Microbiological Research, 2014,

- 169(7/8): 585-592
- [23] Zhao BR, Zhuang GW, Cao DM, et al. Circulation, tidal residual currents and their effects on the sedimentations in the Bohai Sea[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1995, 26(5): 466-473 (in Chinese)
赵保仁, 庄国文, 曹德明, 等. 渤海的环流、潮流及其对沉积物分布的影响[J]. *海洋与湖沼*, 1995, 26(5): 466-473
- [24] Naylor D, DeGraaf S, Purdom E, et al. Drought and host selection influence bacterial community dynamics in the grass root microbiome[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(12): 2691-2704
- [25] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336
- [26] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541
- [27] Kan WJ, Zhang QF, Shi HM, et al. Study on variation trend of nutrient salts in Bohai Bay[J]. *Marine Environmental Science*, 2010, 29(2): 238-241 (in Chinese)
阚文静, 张秋丰, 石海明, 等. 近年来渤海湾营养盐变化趋势研究[J]. *海洋环境科学*, 2010, 29(2): 238-241
- [28] Song JM, Ma HB, Lü XX, et al. Biogeochemical functions of nitrogen in Bohai sediments[J]. *Studia Marina Sinica*, 2003(1): 86-100 (in Chinese)
宋金明, 马红波, 吕晓霞, 等. 渤海沉积物氮的生物地球化学功能[J]. *海洋科学集刊*, 2003(1): 86-100
- [29] Wang RM, Tang JH, Huang GP, et al. Provenance of organic matter in estuarine and marine surface sediments around the Bohai Sea[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(3): 497-507 (in Chinese)
王润梅, 唐建辉, 黄国培, 等. 环渤海地区河流河口及海洋表层沉积物有机质特征和来源[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(3): 497-507
- [30] Liu X, Xiao T, Zhang WY, et al. Diversity of bacterial community in sediments of Jiaozhou Bay[J]. *Marine Sciences*, 2010, 34(10): 1-6, 27 (in Chinese)
刘欣, 肖天, 张文燕, 等. 胶州湾海域表层沉积物细菌多样性[J]. *海洋科学*, 2010, 34(10): 1-6, 27
- [31] Jiang HC, Liu AY, Ren LH, et al. PCR-RFLP Analysis of Bacteria 16S rDNA in Laizhou Bay[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2014(3): 127-134 (in Chinese)
姜会超, 刘爱英, 任利华, 等. 莱州湾海域海水和沉积物中的细菌多样性分析[J]. *海洋湖沼通报*, 2014(3): 127-134
- [32] Bai J, Li HY, Zhang J, et al. Diversity of bacterial community in the sediments of the Northern Yellow Sea[J]. *China Environmental Science*, 2009, 29(12): 1277-1284 (in Chinese)
白洁, 李海艳, 张健, 等. 黄海西北部沉积物中细菌群落 16S rDNA 多样性解析[J]. *中国环境科学*, 2009, 29(12): 1277-1284
- [33] Li L, Kato C, Horikoshi K. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench[J]. *Marine Biotechnology*, 1999, 1(4): 391-400
- [34] Freitag TE, Prosser JI. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1359-1371
- [35] Barns SM, Cain EC, Sommerville L, et al. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(9): 3113-3116
- [36] Yamada T, Sekiguchi Y, Imachi H, et al. Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to Chloroflexi subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 7493-7503
- [37] Chen XH. Study on the diversity of Cytophaga-Flavobacteria cluster in typical areas of the China Seas and the Bering Sea[D]. Xiamen: Master's Thesis of Xiamen University, 2006 (in Chinese)
陈喜涵. 中国典型海域及白令海 *Cytophaga-Flavobacteria* 类群多样性研究[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2006
- [38] Qiao SQ, Shi XF, Bai YZ, et al. Distribution of organic carbon, nitrogen in suspended and surface sediments and their controlling factors off the Huanghe (Yellow River) Mouth and the nearby Bohai Sea[J]. *Acta Sedimentologica Sinica*, 2011, 29(2): 354-362 (in Chinese)
乔淑卿, 石学法, 白亚之, 等. 黄河口及邻近渤海海域悬浮体和沉积物中有机碳、氮的分布特征及其影响因素[J]. *沉积学报*, 2011, 29(2): 354-362
- [39] Jiang HH, Liu SM. Distribution and burial flux of phosphorus in sediments of the Bohai Sea[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(1): 125-132 (in Chinese)
江辉煌, 刘素美. 渤海沉积物中磷的分布与埋藏通量[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(1): 125-132
- [40] Muangchinda C, Chavanich S, Viyakarn V, et al. Abundance and diversity of functional genes involved in the degradation of aromatic hydrocarbons in Antarctic soils and sediments around Syowa Station[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(6): 4725-4735
- [41] Yang FL, Yang JS, Deng CP, et al. Bacterial communities and their hydrocarbon bioremediation potential in the Bohai Sea, China[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2015, 538: 117-130
- [42] Gao MH, Liu JW, Qiao YL, et al. Diversity and abundance of the denitrifying microbiota in the sediment of Eastern China Marginal Seas and the impact of environmental factors[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 73(3): 602-615
- [43] Zhou JZ, Deng Y, Zhang P, et al. Stochasticity, succession, and environmental perturbations in a fluidic ecosystem[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(9): E836-E845
- [44] Li YX. Microbial diversity in sediments of Jiaozhou Bay and East Pacific seamounts (~13°N)[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2008 (in Chinese)
李友训. 胶州湾和东太平洋海隆(~13°N)沉积物微生物多样性研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2008
- [45] Fierer N, Lauber CL, Ramirez KS, et al. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(5): 1007-1017
- [46] Ramirez KS, Craine JM, Fierer N. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes[J]. *Global Change Biology*, 2012, 18(6): 1918-1927