

研究报告



高通量测序分析多种典型生境中厌氧氨氧化细菌的多样性分布特征

洪义国^{*1} 李益本¹ 吴佳鹏² 陈光仕¹ 黄天政¹ 陈帅¹¹ 广州大学大湾区环境研究院 广东 广州 510006² 广州大学环境科学与工程学院 广东 广州 510006

摘要:【背景】厌氧氨氧化过程是氮素循环过程的重要途径之一，在氮素循环中发挥重要作用。先前的研究已经证实了厌氧氨氧化细菌存在于多种生境中，但对其多样性分布还没有系统的研究。【目的】对厌氧氨氧化细菌在不同类型生境中的多样性分布规律进行深入分析，充分展示其不同生境中的群落结构特点，并揭示多样性分布与环境因素之间的关系。【方法】在建立厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因序列数据库的基础上，运用高通量测序技术分析其在不同生境中的多样性分布特征。【结果】厌氧氨氧化细菌在红树林、海湾和河口生境中的多样性水平较高，而污泥和红壤的多样性水平明显较低。系统发育分析表明，这些生境中的厌氧氨氧化细菌主要由 *Candidatus Brocadia*、*Ca. Scalindua* 和未明确分类地位的菌属组成；从河流到红树林生态系统，随着盐度的增加，厌氧氨氧化细菌的优势种属由 *Ca. Brocadia* 转变到 *Ca. Scalindua*，相关性分析也表明了盐度是导致不同生境中厌氧氨氧化细菌群落结构差异的主要因素。【结论】不同生境中存在不同的厌氧氨氧化细菌种群结构，环境条件的差异影响了厌氧氨氧化细菌的种群分布和系统演化。

关键词: 厌氧氨氧化细菌，典型生境，多样性特征，高通量测序分析

Diversity analysis of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in typical habitats by high throughput sequencing

HONG Yi-Guo^{*1} LI Yi-Ben¹ WU Jia-Peng² CHEN Guang-Shi¹ HUANG Tian-Zheng¹ CHEN Shuai¹¹ Institute of Environmental Research at Greater Bay, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006, China² School of Environmental Science and Engineering, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006, China

Abstract: [Background] Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) is one of the important processes of nitrogen cycling. Previous studies have confirmed that anaerobic ammonium-oxidizing bacteria existed in various habitats, but there is no comprehensive understanding about their ecological distribution. [Objective] In this paper, we analyzed the diversity distribution of anammox bacteria in multiple habitats.

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31870100, 41576123, 91851111); Research Foundation for Talented Scholars of Guangzhou University (GZHU-B-05)

***Corresponding author:** Tel: 86-20-39158007; E-mail: yghong@gzhu.edu.cn

Received: 15-11-2018; **Accepted:** 18-04-2019; **Published online:** 18-06-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31870100, 41576123, 91851111); 广州大学百人计划人才引进启动基金(GZHU-B-05)

***通信作者:** Tel: 020-39158007; E-mail: yghong@gzhu.edu.cn

收稿日期: 2018-11-15; **接受日期:** 2019-04-18; **网络首发日期:** 2019-06-18

This study will demonstrate the characteristics of community structure of anammox bacteria in different habitats and will illuminate the relationship between diversity distribution and environmental factors. **[Methods]** Based on the established anammox bacterial 16S rRNA gene sequence database, high throughput sequencing technology was used to analyze the diversity distribution of anammox bacteria in different habitat. **[Results]** The diversity of anammox bacteria in mangrove, bay and estuary habitats were relatively higher than that of sludge and red soil. Anammox bacteria in these habitats were dominated by *Candidatus Brocadia*, *Ca. Scalindua* and unclassified genes based on the phylogenetic analysis. From river to mangrove, the dominant species of Anammoxers shifted from *Ca. Brocadia* to *Ca. Scalindua* with the increase of salinity, and redundancy analysis showed that salinity was an important factor in shaping the community of anammox bacteria. **[Conclusion]** The community structure of anammox bacteria is different in different habitat, and environmental differences directly affected the population distribution and the evolution of anammox bacteria.

Keywords: Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria, Typical habitat, Diversity, High-throughput sequencing

在 1977 年, Broda 根据热力学计算分析, 推测在自然界中可能存在一种自养型菌, 能在厌氧条件下以 NO_2^- 作为电子受体氧化 NH_4^{+} ^[1]。1995 年, Mulder 等首次在污水处理系统中发现这种脱氮途径, 并命名为厌氧氨氧化 (Anaerobic ammonia oxidation, Anammox)^[2]。进一步的研究证实 Anammox 实质上是微生物作用的过程, 其电子供体和电子受体分别是 NH_4^+ 和 NO_2^- ^[3]。2002 年, Dalsgaard 等首次在自然环境中发现 Anammox 过程的存在^[4]。此后陆续的研究表明, Anammox 在自然生态系统中广泛分布, 包括海洋生态系统^[5-7]、河口和海湾生态系统^[8-9]、淡水生态系统^[10-11]、土壤生态系统^[12-13]以及一些特殊的生境, 如火山口、极地沉积物、高温油库等^[14]。Anammox 的发现打破了认为反硝化是唯一微生物脱氮途径的传统认识, 对理解全球氮循环具有重要的意义, 并且在废水脱氮处理中具有广阔的应用前景。

厌氧氨氧化细菌 (Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria) 是厌氧菌, 该菌生长缓慢, 至今未能通过传统的微生物分离培养方法实现纯培养。1999 年, Strous 等通过 16S rRNA 基因进化分析揭示这类微生物属于浮霉菌门 (*Planctomycetes*)^[15]。至今发现的厌氧氨氧化细菌有 6 个属, 包括 *Candidatus Brocadia*、*Ca. Kuenenia*、*Ca. Scalindua*、*Ca. Jettenia*、*Ca. Anammoxoglobus* 和 *Ca. Anammoximicrobium moscowii*。目前发现厌氧氨氧化细菌在海洋生态系

统中广泛存在且异常活跃, 对海洋氮转化的贡献为 30%–50%^[16]; 但其种群组成比较单一, *Ca. Scalindua* 属的比例占绝对优势, 推测与其具有较强的耐盐性有关^[8]。河口和海湾生态系统作为海陆交界地带, 淡水和海水的相互作用使得各种营养物质不断变化, 形成适合多个种属厌氧氨氧化细菌生存的微环境。研究表明, *Ca. Brocadia*、*Ca. Kuenenia*、*Ca. Scalindua* 等多个属的厌氧氨氧化细菌共同存在于这一生境中^[9,17]。河流、湖泊等淡水生态系统中的厌氧氨氧化细菌也表现出较高的多样性水平, *Ca. Brocadia*、*Ca. Kuenenia*、*Ca. Scalindua*、*Ca. Anammoxoglobus* 属均被检测到。Schubert 等首次在淡水环境中检测到厌氧氨氧化细菌的存在, 且大多数为 *Ca. Brocadia* 属, 其对氮转化的贡献率与海洋环境相似^[18]。此外, 在湿地、农田土壤、沼泽、永久冻土等不同的土壤生态系统中均检测到厌氧氨氧化细菌的存在^[12,19]。然而, 目前对于土壤生态系统中 Anammox 过程的研究还较少, 且在一定深度范围内的土壤中发现有厌氧氨氧化细菌的分布, 表明了厌氧氨氧化细菌分布的空间异质性。

为了更清晰地展示厌氧氨氧化细菌在不同生境中的分布特征, 对已经发表的相关序列进行了搜集整理和系统分析, 发现不同生境中具有显著不同的群落结构组成。然而先前的研究都是基于某个生境的独立分析, 而且都是基于克隆文库的构建, 对于不同生境中厌氧氨氧化菌多样性分布的认识还

不够系统和深入, 还需要做更进一步的深入分析, 为阐释厌氧氨氧化细菌在不同生境中的分布特征提供实验依据。本研究选取了红树林生态系统、海湾和河口生态系统、河流生态系统、土壤生态系统和人工生态系统等多种典型生境的样品, 通过对厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因的高通量测序, 研究多种典型生境下厌氧氨氧化细菌的多样性特征, 并结合环境条件分析环境因子对厌氧氨氧化细菌群落结构的影响。本研究将为深入了解不同生境中厌氧氨氧化细菌的多样性分布特征以及与环境因子之间的关系提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集与保存

所用样品均为沉积物或者土壤类型, 选取了红树林、海湾、河口、河流、土壤和人工 6 种典型生境共 15 个样品进行分析。Mros1 和 Mros2 样品采集于广东省惠州市沿海红树林区域; JZB1 和 JZB2 样品采集于胶州湾; PR1、PR2 和 PR3 样品采集于珠江口; DJR1、DJR2 和 DJR3 样品分别采集于东江上游、中游、下游; RS1 和 RS2 的样品采集于湖南省邵阳市的红壤; HC 和 HN 采集于本实验室内构建的人工反应器; WW 样品采集于广州市沥滘污水厂污泥。

对现场采集的环境样品混匀后立即置于聚乙烯密封袋中, 排尽空气后密封, 用冰盒储存带回实验室-80 °C 保存。一部分样品用于理化参数的测定, 一部分用于 DNA 的提取和后续分子生物学实验。

1.2 主要试剂和仪器

PowerSoil[®] DNA Isolation Kit, Qiagen 公司; GoTaq[®] Green Master Mix, Promega 公司; TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit, TaKaRa 公司; PCR 引物由 Invitrogen 公司合成。PCR 仪, ABI 公司; NanoDrop 核酸定量仪, Thermo 公司; 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

1.3 理化指标的测定

样品混匀后进行离心(5 000 r/min, 5 min), 抽

取离心后的上清液进行盐度和营养盐的测定。样品的盐度采用盐度计直接测定, NO₃⁻的测定采用本实验室建立的小体系连续快速测定水体溶解性硝酸盐浓度的方法^[20]; NO₂⁻浓度根据《海洋调查规范 GB/T 12763.4-2007》规定的重氮-偶氮法来测定; NH₄⁺采用使用小体系连续快速测定水体溶解性铵盐的方法进行^[21]。

1.4 样品 DNA 提取和 PCR 扩增

称取沉积物或者土壤样品约 0.3 g, 按照土壤 DNA 提取试剂盒(PowerSoil[®] DNA Isolation Kit)操作说明书提取样品中的总 DNA。将提取到的总 DNA 溶解在 50 μL 无核酸酶水中, 并用 NanoDrop 核酸定量仪测定 DNA 浓度与质量。提取后的 DNA 放置于-80 °C 保存。

以提取的 DNA 为模板, 采用厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因的一对特异性引物 A438f (5'-XXX XXXXXGTCRGGAGTTADGAAATG-3') 和 A684r (5'-ACCAGAAGTTCCACTCTC-3') 对样品进行 PCR 扩增^[22]。其中 XXXXXXXX 为 8 个碱基的标签序列(Barcode), 每个样品使用的 Barcode 序列都是不同的, 以便于对后续测定的样品序列进行分拣。该引物特异性好, 适合检测不同生境的 Anammoxer^[22-26]。PCR 反应体系 (25 μL): 2×GoTaq[®] Green Master Mix 12.5 μL, 10 μmol/L 的正、反向引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL, 使用无核酸酶纯水补足至 25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 94 °C 45 s, 49 °C 45 s, 72 °C 45 s, 32 次循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色后用凝胶成像系统进行验证, 并按照样本目标测序深度对验证后的 PCR 产物进行相应比例混合, 按照相同体积 PCR 产物在凝胶成像系统中的亮度从强到弱依次分为 1-4 四个等级, 分别加入 1-4 等级的 PCR 产物为 2、4、6 和 8 μL 进行混合。使用胶回收试剂盒对混合后的 PCR 产物进行切胶纯化, 将纯化产物进行高通量测序, 测序平台为 Illumina HiSeq pe150, 委托苏州金唯智生物科技有限公司完成。将得到的 Anammoxer 16S

rRNA 基因高通量测序结果提交至 NCBI SRA (登录号为 PRJNA506364)。

1.5 高通量测序数据的处理和分析

对高通量测序数据进行处理前,需要构建厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因参考数据库。收集了近 20 年来发表的与厌氧氨氧化细菌在不同生境中多样性分布研究的相关文献,根据文献中公布的厌氧氨氧化细菌的 16S rRNA 基因的序列号(部分序列直接来自数据库),在 NCBI 基因数据库上下载相关基因序列。总共收集了 12 614 条序列,这些序列来自全球不同的研究区域和不同类型的生境。首先,从 GenBank 数据库中下载通过分离或富集培养的厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因序列作为种子序列;然后,从 FunGene 数据库中下载已有的环境样品 Anammox 基因序列;将获得的所有序列使用 Mothur 软件进行质控,生成厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因参考数据库。

高通量测序的序列经过质控和分拣后,按照 Mothur 软件(V1.39.5)标准操作流程对序列进行处理和分析。(1) 参照构建的厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因参考数据库,使用 MEGA 7.0 软件进行序列对齐。(2) 对每个样品的序列长度进行控制,删除过短序列;对序列名称进行简化,并去除 Barcode 序列。(3) 筛选去除冗余序列和嵌合体序列。(4) 运用构建好的厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因参考数据库,确定样品序列的归类种属信息;将每一条经质控后的序列与厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因参考数据库比对,找出与其最相近且可信度达 80%以上的参考序列种属信息。(5) 计算序列两两之间的相似度,生成距离矩阵文件。(6) 基于生成的距离矩阵,对序列进行操作分类操作单元(Operational taxonomic units, OTU)聚类,相似性阈值为 97%。(7) 过滤低丰度 OTU,去除序列数仅为 5 的 OTU,提取主要 OTU 的代表序列。(8) 基于非稀有 OTU 在每个样品中的丰度,计算样品中的 α 多样性指数;基于主坐标分析(Principal co-ordinates analysis, PCoA)进

行 β 多样性分析。

根据稀释曲线可判断样品的测序深度是否满足多样性分析;根据等级丰度曲线可判断样品的物种丰富度和均匀度;统计隶属于每个种属中 OTU 的序列条数,可得到各样品中厌氧氨氧化细菌在属水平的相对丰度。根据基于 OTU 的系统发育树和热图,可分析得到不同生境样品中厌氧氨氧化细菌的群落结构和组成。使用 Origin、Excel 等软件进行厌氧氨氧化细菌的 α 多样性和 β 多样性的相关图绘制。在 α 多样性指标中,利用 Ace 指数、Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 多样性指数判断群落多样性。在 β 多样性指标中,利用主坐标分析(PCoA)比较各样点间群落的差异。根据 OTU 聚类结果以及各个样品的 OTU 分布状况,结合样品的环境参数,使用 CANOCO 5.0 软件分析影响厌氧氨氧化细菌群落结构及分布的主要环境因素。

2 结果与分析

2.1 理化指标分析

实验测得的 15 个样品的理化指标数据如表 1 所示。结果表明,除了红树林、海湾和河口生态系统存在较高盐度,其他生境样品的盐度都较低。在溶解无机氮(Dissolve inorganic nitrogen, DIN)的含量上,HN 样品孔隙水的 NO_3^- 浓度比较特殊,高达 $1\,500\,\mu\text{mol/L}$;而 JZB1、JZB2、DJR1、DJR2、DJR3 孔隙水的 NO_3^- 浓度较高;可以看出:JZB1 的 NO_3^- 浓度明显低于 JZB2,而 DJR1、DJR2、DJR3 的 NO_3^- 浓度的差别也很明显;所有样品除了 HC 和 HN 外, NO_2^- 的浓度都比较低; NH_4^+ 在不同的样品中差别也较大,在东江、珠江口以及胶州湾的沉积物中含量较高。

2.2 厌氧氨氧化细菌的多样性指数特征

对实验全部样品进行 α 多样性指数统计分析。从每个样品的原始序列库中随机筛选 10 000 条进行分析。表 2 表明,原始序列经过质控后,样品序列数在 7 529–9 198 之间,样品的 OTU 数在 55–127

表 1 采样位点的物理化学参数

Table 1 Physicochemical parameter of sampling sites

样品 Sample	经度 Longitude (°)	纬度 Latitude (°)	盐度 Salinity (%)	铵盐 NH ₄ ⁺ (μmol/L)	硝酸盐 NO ₃ ⁻ (μmol/L)	亚硝酸盐 NO ₂ ⁻ (μmol/L)	生态系统类型 Ecosystem-type
Mros1	114.78	22.83	2.223	1.54	0.97	0.51	红树林 Mangrove
Mros2	114.78	22.83	2.477	1.29	3.71	0.52	红树林 Mangrove
JZB1	120.28	36.29	3.110	3.12	8.45	0.38	海湾 Bay
JZB2	120.42	36.35	3.111	12.28	30.95	0.74	海湾 Bay
PR1	113.51	23.03	0.015	29.32	92.09	4.17	河口 Estuary
PR2	113.75	22.52	0.501	4.52	10.45	0.63	河口 Estuary
PR3	113.72	21.99	3.237	2.38	12.39	1.76	河口 Estuary
DJR1	114.72	24.05	—	2.35	14.62	0.64	河流 River
DJR2	114.60	23.16	—	15.67	68.37	0.64	河流 River
DJR3	113.99	23.09	—	34.82	146.24	1.03	河流 River
RS1	116.33	27.95	—	0.28	1.17	0.53	土壤 Soil
RS2	111.45	27.38	—	0.58	2.09	0.58	土壤 Soil
HC	113.63	22.60	—	15.23	1.23	88.72	人工系统 Artificial system
HN	113.63	22.60	—	18.92	1 500.00	6.16	人工系统 Artificial system
WW	113.35	23.04	—	1.34	2.01	0.98	人工系统 Artificial system

注：—：淡水样品，盐度<0.1%.

Note: —: Freshwater sample with salinity lower than 0.1%.

表 2 不同样品中的厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因的多样性指数

Table 2 Diversity index of anammoxers 16S rRNA gene sequences of different habitats

Sample	Unique sequences	Coverage	OTUs	Ace	Chao1	Simpson	Shannon
Mros1	8 121	0.99	99	140.45	125.90	0.25	2.31
Mros2	8 014	0.99	99	111.17	110.82	0.14	2.74
JZB1	7 898	0.99	127	144.78	145.65	0.05	3.49
JZB2	7 529	0.99	95	125.99	107.21	0.08	2.93
PR1	8 485	0.99	87	101.64	103.09	0.17	2.41
PR2	7 891	0.99	126	146.75	152.58	0.08	3.16
PR3	7 823	0.99	113	122.74	125.88	0.09	3.06
DJR1	9 028	0.99	70	81.65	84.98	0.82	0.62
DJR2	8 793	0.99	73	134.89	107.28	0.13	2.49
DJR3	9 057	0.99	73	93.67	87.62	0.75	0.79
RS1	9 198	0.99	62	75.30	71.27	0.86	0.49
RS2	9 188	0.99	67	92.51	86.37	0.88	0.41
HC	8 092	0.99	66	73.42	69.67	0.19	2.20
HN	8 186	0.99	58	64.57	61.99	0.18	2.27
WW	9 088	0.99	55	89.64	71.12	0.88	0.42

之间。其中海湾 JZB1 样品的 OTU 最多，为 127；污泥(WW)的 OTU 数最少，为 55。测序结果覆盖率均在 99.7%以上，表明得到的多样性指数有较好的可靠性。结合稀释曲线(图 1A)可以看出，起初随着序列数的增加，样品中 OTU 迅速增加；而随着序列数的进一步增加，OTU 数量增加的趋势逐渐变缓，稀释曲线趋于饱和，说明所用样品的序列

数能够充分展示样品中的厌氧氨氧化细菌的多样性，与序列高覆盖率(>99.7%，见表 2)反映的结果相符。表 2 呈现出不同生境样品中明显的多样性变化趋势：红树林生态系统(Mros1、Mros2)、海湾生态系统(JZB1、JZB2)、河口生态系统(PR1、PR2、PR3)这三类生态系统的 Ace 指数、Chao1 指数和 Shannon 指数都较高，而 Simpson 多样性指数较低，

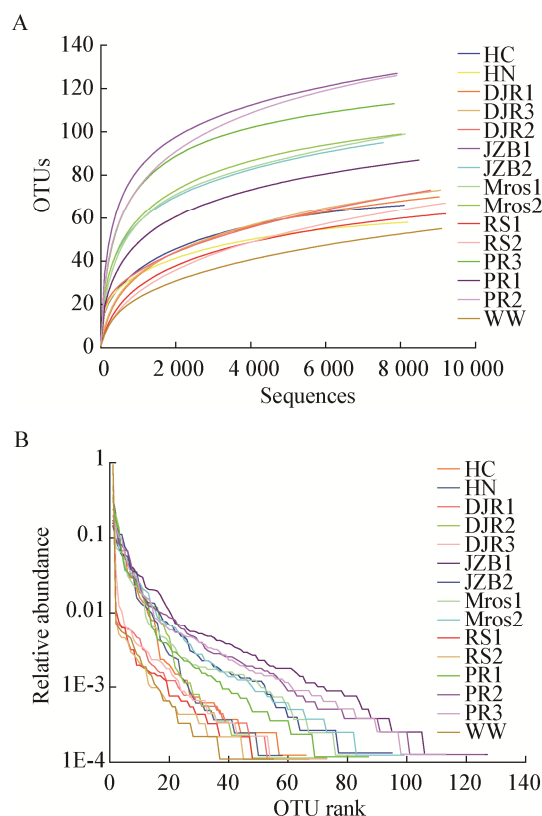


图1 厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因基于高通量测序分序 OTU 稀释曲线(A)和等级丰度曲线(B)

Figure 1 Rarefaction curves (A) and grade abundance curves (B) of the anammox specific 16S rRNA gene sequences in different habitats

表明这三类生态系统样品的生物多样性都较高;与之相反的是:红壤(RS1、RS2)和污泥(WW)的 Ace 指数、Chao1 指数和 Shannon 指数都较低,而 Simpson 多样性指数较高,表明这两类生态系统的生物多样性都较低。

结合等级丰度曲线(图 1B)分析, JZB1、PR3、PR2 的等级丰度曲线在横轴上的长度都比较大,且比较平滑地下降,表明这 3 个样品所含物种较丰富、多样性较高。而 WW、RS1、RS2 的等级丰度曲线在横轴上的长度都比较短,且快速陡然地下降,表明这 3 个样品所含物种较少,样本中的优势菌群所占比例很高、多样性较低。综合来看, JZB1 的生物多样性最高, WW 的生物多样性最低。

2.3 不同生境中厌氧氨氧化细菌的种属分布特征

根据 Mothur 分析结果绘制每个样品中厌氧氨氧化细菌的种属分布图(图 2)。对单个样品而言, *Ca. Scalindua* 属在 Mros1、Mros2、JZB2、PR3 中有明显优势,分别达到了 64.54%、68.55%、87.18%、59.72%,且在 JZB1 和 PR2 也占有一定的比例,分别达到了 30.62%、28.66%; *Ca. Brocadia* 属在绝大部分样品(PR1、PR2、DJR1、DJR2、DJR3、RS1、

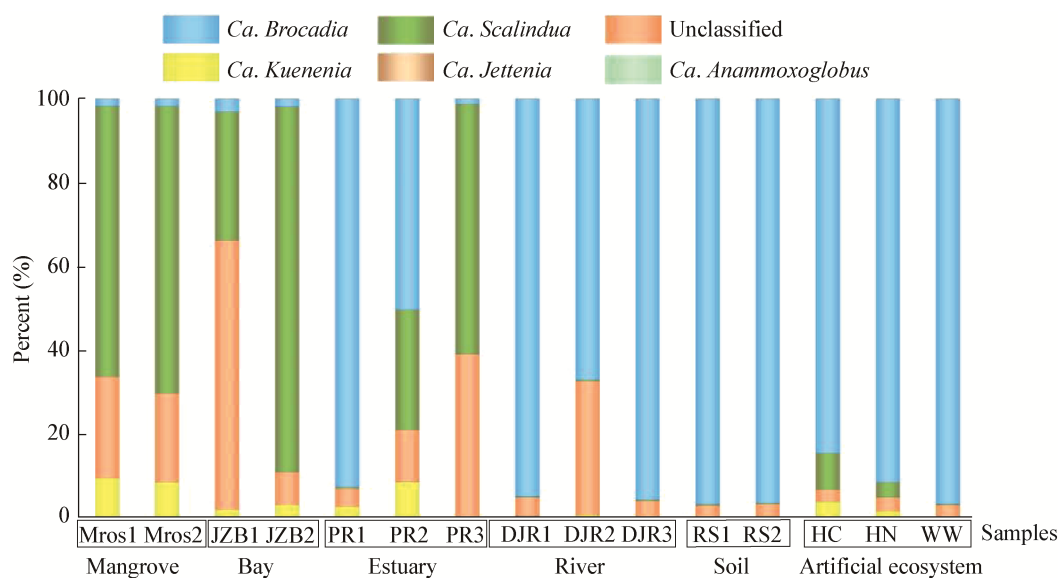


图2 不同生境中厌氧氨氧化细菌在属水平上的群落结构组成

Figure 2 Composition of anammox bacteria in different habitats in genus level

RS2、HC、HN、WW)有明显优势,部分高达90%以上。*Ca. Kuenenia* 属只在部分样品中存在,且比例普遍较低(10%以下);而 *Ca. Jettenia* 和 *Ca. Anammoxoglobus* 属在样品中的相对丰度非常低。值得注意的是,未明确分类地位的种属(Unclassified)在部分样品中的比例较高,在 JZB1 中高达64.48%,推测还存在多种未被鉴定的新种属。

对不同生态系统而言,河流生态系统(DJR1、DJR2、DJR3)、土壤生态系统(RS1、RS2)和污泥(WW)的厌氧氨氧化细菌种属组成类似, *Ca. Brocadia* 属占绝对优势,但多样性水平较低。红树林生态系统(Mros1、Mros2)、海湾生态系统(JZB1、JZB2)和河口生态系统(PR2、PR3)的厌氧氨氧化细

菌种属组成相近,种群多样性较高, *Ca. Scalindua* 属是优势种属,另外都能检测到少量的 *Ca. Kuenenia* 和 *Ca. Brocadia* 属,该结果与先前的研究结果一致^[27]。

2.4 基于 OTU 的厌氧氨氧化细菌系统发育和热图分析

基于 OTU 聚类结果,挑选序列数大于总序列数 1%的 OTU 代表序列,共提取了 10 条代表序列, TOP10 OTU 的序列总数占总序列数的 97%以上。将提取到的代表序列与已知 Anammoxer 的基因序列进行比较,将序列对齐后,用 MEGA 7.0 以邻接(Neighbor-Joining)法构建系统发育树(图 3)。结果表明:选取的 15 个样品的厌氧氨氧化细

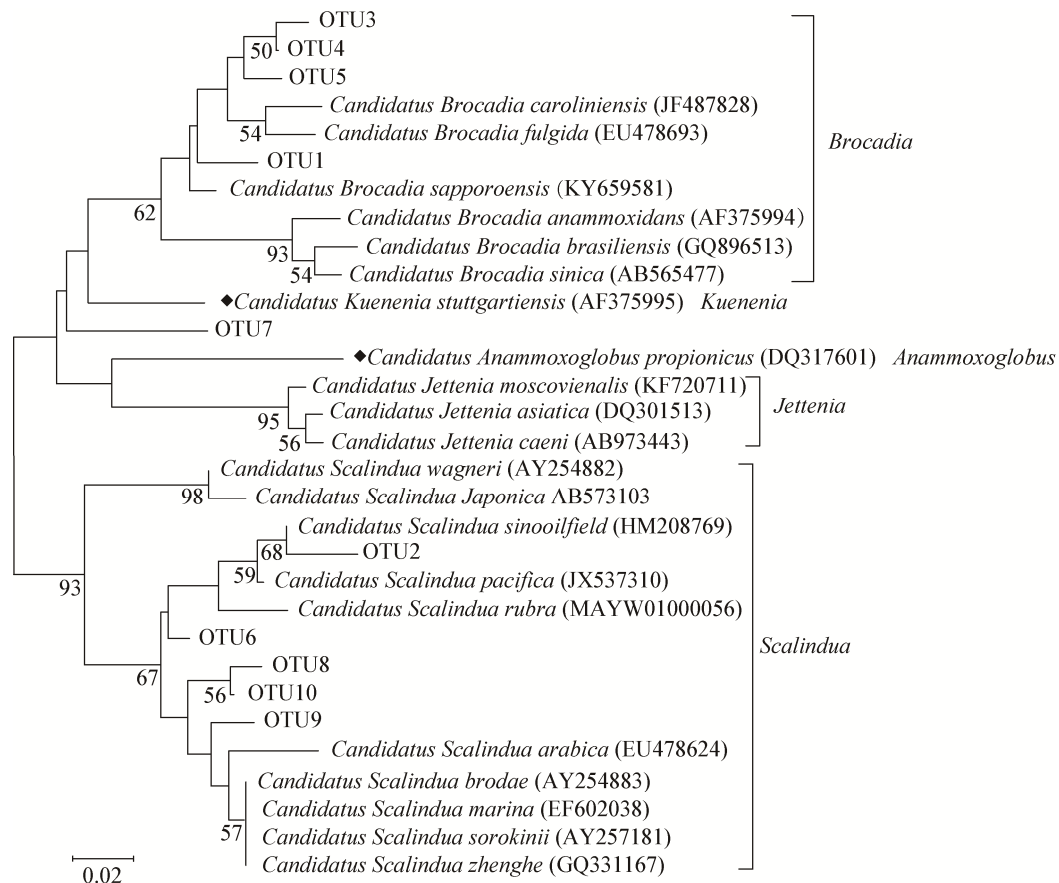


图 3 基于 16S rRNA 基因高通量测序分析多种生境中厌氧氨氧化细菌主要 OTU 的系统进化

Figure 3 Phylogenetic analysis of dominant OTU of anammox specific 16S rRNA gene based on the high-throughput sequencing

Note: This tree was constructed with a Neighbor-Joining method based on Jukes-Cantor-corrected DNA distances and midpoint rooted. The scale bar represents 2% estimated sequence divergence. The numbers at the nodes are percentages that indicate the levels of bootstrap support based on 1 000 resampled data sets.

菌主要 OTU 分为 3 大簇。其中, OTU1 (50.94%)、OTU3 (11.00%)、OTU4 (7.81%)、OTU5 (5.68%) 归类为 *Ca. Brocadia* 属; OTU2 (11.13%)、OTU6 (2.93%)、OTU8 (2.63%)、OTU9 (2.60%)、OTU10 (2.54%) 归类为 *Ca. Scalindua* 属; 而 OTU7 (2.74%) 为 Unclassified 种属 (未明确分类地位的菌属)。主要 OTU 均为 *Ca. Brocadia* 属。

通过热图展示了厌氧氨氧化细菌的群落结构在 OTU 水平的分布(图 4), 图 4 中每个方块代表对应的 OTU, 方块的颜色代表该 OTU 的相对丰度水平(颜色从浅蓝到深蓝代表序列丰度由低到高)。可以看出, OTU1 主要分布在 WW、RS1、RS2、DJR1、DJR3, OTU2 主要分布在 Mros1, PR2、PR3 中 10 个 OTU 都有所分布。

2.5 不同类型生境中厌氧氨氧化细菌的种属分布差异

基于 OTU 聚类结果, 采用 Mothur 软件中的

Thetayc 算法计算各样品之间的差异, 从而对厌氧氨氧化细菌的群落排序, 选取解释度最大的两轴作主坐标分析图(Principal co-ordinates analysis, PCoA) (图 5), 分析不同生境中厌氧氨氧化细菌的聚类关系。由图 5 可知, P1 主成分对排序结果的解释度为 38.9%, P2 主成分对排序结果的解释度为 30.1%, P1 和 P2 主成分累计对排序结果的解释度为 69.0%。P1 和 P2 主成分共同将 15 个样品分成 3 个簇: PR1、PR2、HC、HN 这 4 个样品为一簇, 说明 PR1、PR2、HC、HN 的群落结构比较类似; JZB1、JZB2、Mros1、Mros2、PR3 这 5 个样品为一簇, 且距离都比较接近, 说明这几个样品的群落结构都比较类似; 而 DJR1、DJR3、RS1、RS2、WW 这 5 个样品在 PCoA 图上几乎看不出距离, 说明这几个样品的群落结构非常类似。总体而言, 簇与簇之间的距离都比较大, 说明每个簇内样品的群落结构与其他簇之间都有较大差异。值得注意的

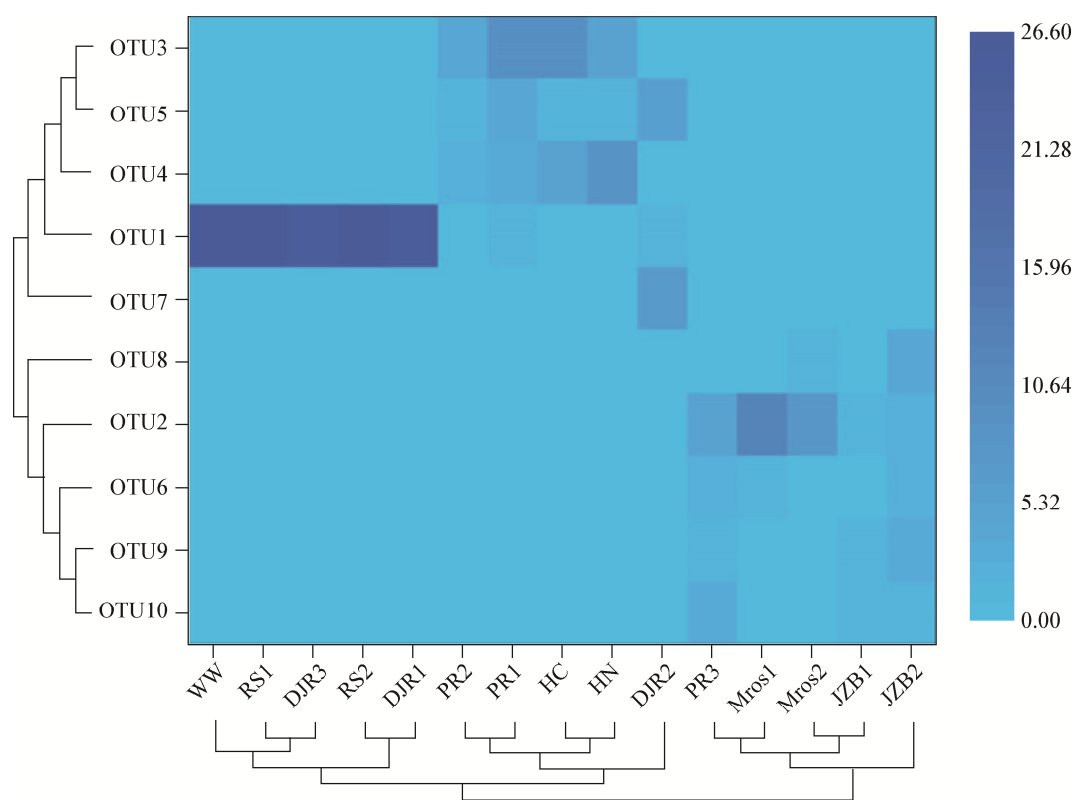


图 4 不同生境中厌氧氨氧化细菌主要 OTU 在不同生境中的热图分析

Figure 4 Heatmap analysis of dominant OTU of anammox bacteria in different habitat

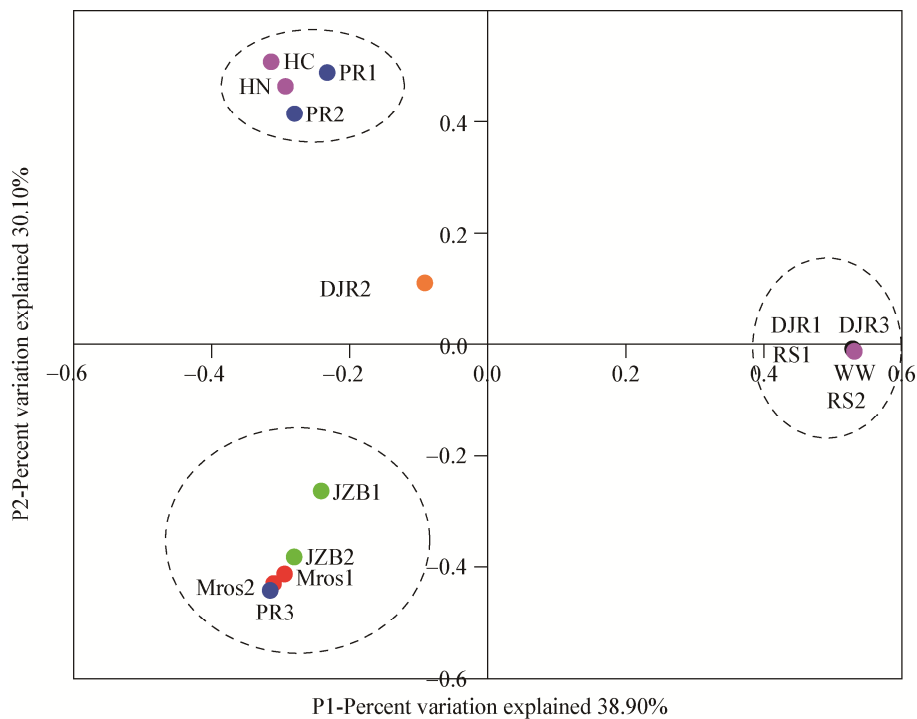


图 5 不同生境中厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因序列的 PCoA 分析
Figure 5 Principal co-ordinates analysis (PCoA) for each habitat based on the anammox specific 16S rRNA gene sequences

是, DJR2 与其他样品的距离都比较远, 说明 DJR2 的群落结构与其他样品差异都比较大, 推测可能是因为 DJR2 所在的区域厌氧氨氧化细菌生存的微环境与其他样品间的差异较大。

对比样品和它们代表的生境在 PCoA 图上的位置, 可以发现红树林生态系统、海湾生态系统和河口生态系统的群落结构比较类似, 但与河流生态系统的群落结构差异较大。结合红树林(Mros1、Mros2)、胶州湾(JZB1、JZB2)和东江(DJR1、DJR2、DJR3)的盐度和可溶解无机氮(Dissolve inorganic nitrogen, DIN) (表 1), 推测可能是因为河口和海湾生态系统作为淡水和海水相互作用最强烈的区域, 形成的厌氧氨氧化细菌生存的微环境类似, 因此这两类生态系统的群落结构差异不大; 而 DJR1、DJR2、DJR3 属于淡水河流生态系统, 其环境条件与河口、海湾生态系统区别较大, 导致厌氧氨氧化细菌生存的微环境不同, 因此群落结构差异较大。

2.6 环境因子对厌氧氨氧化细菌群落结构的影响分析

根据 OTU 聚类结果以及各个样品的 OTU 分布状况, 结合样品的环境参数, 使用 CANOCO 5.0 软件进行冗余分析(Redundancy analysis, RDA), 结果如图 6 所示。RDA 分析产生 4 个排序轴, 图中显示 2 个, 即排序轴 RDA1 和 RDA2。排序轴 RDA1 和 RDA2 的特征值分别为 0.584 和 0.185, 方差变量解释分别为 46.93%和 29.78%, 累计解释了厌氧氨氧化细菌群落结构累积方差变量的 76.71%, 说明此次 RDA 排序结果是可靠的。采用前向选择法(Forward selection)对全部环境变量进行选择, 结果表明在盐度、NO₂⁻和 NO₃⁻三种环境参数中, 只有盐度对厌氧氨氧化细菌起到显著性影响($P=0.002<0.05$, NO₂⁻和 NO₃⁻的 P 值分别是 0.198 和 0.322)。盐度的方差变量贡献率为 86.3% ($F=18.3$), 对群落结构变异信息的解释度为 58.4%, 这表明盐度是影响本研究中样品厌氧氨氧化细菌

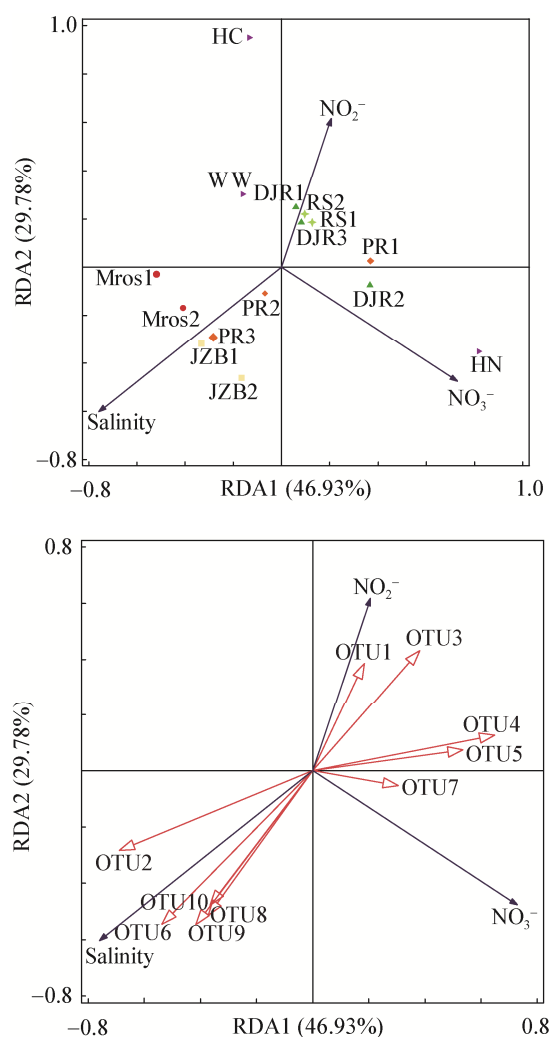


图6 不同生境以及主要 OTU 与环境因子的 RDA 分析
Figure 6 RDA analysis for the relationship between the habitats or dominant OTU of anammox bacteria and environmental factors

群落结构分布的主要因素。不同生态系统环境因素的差异是影响厌氧氨氧化细菌群落结构和分布的重要原因。近年来对环境中 Anammox 的研究聚焦于环境因子与群落结构、多样性水平、空间分布及丰度差异的关系。2007 年, Schmid 等对黑海、日本海等 11 个盐度较高的海域(盐度为 17–35 PSU)进行研究,发现这些海域的厌氧氨氧化细菌均属于 *Ca. Scalindua* 属^[27]。随后, Dale 等证实了在海洋环境中,随盐度的递增厌氧氨氧化细菌的优势种群从 *Ca. Brocadia* 转变为 *Ca. Scalindua*, 而且在高盐

环境中仅有 *Ca. Scalindua* 存在^[8]。2011 年, Hirsch 等的研究表明盐度是多种生态系统中厌氧氨氧化细菌群落结构和分布特征存在差异的首要原因^[28]。大量研究结果表明厌氧氨氧化细菌存在盐度耐受性差异,证实了盐度是导致厌氧氨氧化细菌群落结构和分布特征差异性的重要因素。

目前,大量研究结果表明厌氧氨氧化细菌存在盐度耐受性差异。其中, *Ca. Scalindua* 属的盐度耐受性最高, 而 *Ca. Brocadia* 属最低。在本研究中, 从河流生态系统到红树林生态系统,随着盐度的增加,厌氧氨氧化细菌的优势种属由 *Ca. Brocadia* 属转变到 *Ca. Scalindua* 属, 进一步证实了盐度是导致厌氧氨氧化细菌种属组成和分布存在差异的重要因素。除了盐度和氮素营养盐外,温度、溶解氧、深度、pH 等也是影响厌氧氨氧化细菌分布特征的环境因子。由于环境因子是同时存在的, 因此难以说明单独一种环境因子对厌氧氨氧化细菌的影响, 仍需进一步研究厌氧氨氧化细菌应对不同环境因子的适应机制。

3 讨论与结论

对于厌氧氨氧化细菌在不同生境的多样性群落结构,先前的研究基本上都是基于单一生境进行的,例如海洋、河口、淡水、在湿地、农田土壤、沼泽、永久冻土等不同的土壤生境中均检测到厌氧氨氧化细菌的存在^[4-14,19], 而且认识到不同的生境中有不同的多样性分布特征。然而,先前的研究存在问题:一是没有对多种生境进行系统的分析,导致厌氧氨氧化细菌生态分布的信息不系统;二是先前的研究基本是基于克隆文库的构建,得到的基因序列数非常有限,对于样品的厌氧氨氧化细菌多样性分析不够深入。本研究选取多个典型生境的样品作为研究对象,采用高通量测序技术对样品中厌氧氨氧化细菌的多样性进行了深度展示,并用统一的方法对多个生境的样品进行了一致性分析,更客观地揭示了厌氧氨氧化细菌在自然环境的分布特征和多样性特征。

本研究主要采用特异性引物 A438f 和 A684r 所产生的 250 bp 的 16S rRNA 基因序列, 对不同生境中厌氧氨氧化细菌的群落结构进行了分析。首先, 先前的研究已经证实了 A438f/A684r 引物对目前已知厌氧氨氧化菌的类群都有很好的兼并性, 为多样性的分析提供了重要基础^[25,29]。此外, 用这对引物扩增得到的 250 bp 的产物, 为高通量测序也带来了方便, 使用高通量测序深度解析了环境中厌氧氨氧化细菌的多样性组成。同时, 我们也注意到, 在细菌一个细胞中 16S rRNA 基因的多拷贝问题是否影响多样性的分析也是值得思考的重要问题。从目前几个典型的被鉴定的厌氧氨氧化菌株之间的相似性来看, 在属水平上的 16S rRNA 基因的相似性会超过 3%^[28]; 而且绝大多数原核微生物基因组中多拷贝的 16S rRNA 基因序列通常是相同或是有非常高相似度(大于 99%)^[29]。因此, 16S rRNA 基因的多拷贝应当不会影响厌氧氨氧化细菌的多样性分析。

本研究得到的主要结论为: (1) 红树林、海湾和河口生态系统的样品多样性水平较高, 而污泥和土壤生态系统的多样性水平较低。其中, 海湾生态系统(JZB1)的多样性水平最高, 污泥的多样性水平最低。(2) 系统发育分析结果表明, 本研究选取的 15 个样品的厌氧氨氧化细菌可以分为 *Ca. Brocadia*、*Ca. Scalindua* 和未明确分类地位的菌属(Unclassified)这三大簇。主要 OTU 均属于 *Ca. Brocadia* 属。(3) 污泥、河流和土壤生态系统种属组成类似; 红树林、海湾和河口生态系统种属组成类似。从河流生态系统到红树林生态系统, 随着盐度的增加, 厌氧氨氧化细菌的优势种属由 *Ca. Brocadia* 属转变到 *Ca. Scalindua* 属。(4) 河口和海湾生态系统的群落结构相似, 与河流生态系统差异较大; 土壤与河流生态系统的群落结构非常相似。RDA 结果表明, 盐度是影响厌氧氨氧化细菌群落结构和分布的主要因素。总之, 厌氧氨氧化细菌具有多样性的分布特征, 在不同生境中有不同的群落结构组成, 这可能是长期适应不同环境演化的结果。

REFERENCES

- [1] Broda E. Two kinds of lithotrophs missing in nature[J]. Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 1977, 17(6): 491-493
- [2] Mulder A, van de Graaf AA, Robertson LA, et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1995, 16(3): 177-183
- [3] van de Graaf AA, de Bruijn P, Robertson LA, et al. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor[J]. Microbiology, 1996, 142(8): 2187-2196
- [4] Dalsgaard T, Thamdrup B. Factors controlling anaerobic ammonium oxidation with nitrite in marine sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3802-3808
- [5] Dalsgaard T, Canfield DE, Petersen J, et al. N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica[J]. Nature, 2003, 422(6932): 606-608
- [6] Kuypers MMM, Sliekers AO, Lavik G, et al. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea[J]. Nature, 2003, 422(6932): 608-611
- [7] Hong YG, Li M, Cao HL, et al. Residence of habitat-specific anammox bacteria in the Deep-Sea subsurface sediments of the South China Sea: analyses of marker gene abundance with physical chemical parameters[J]. Microbial Ecology, 2011, 62(1): 36-47
- [8] Dale OR, Tobias CR, Song B. Biogeographical distribution of diverse anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria in Cape Fear River Estuary[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(5): 1194-1207
- [9] Hou LJ, Zheng YL, Liu M, et al. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacterial diversity, abundance, and activity in marsh sediments of the Yangtze Estuary[J]. Journal of Geophysical Research: Biogeosciences, 2013, 118(3): 1237-1246
- [10] Hamersley MR, Woebken D, Boehrer B, et al. Water column anammox and denitrification in a temperate permanently stratified lake (Lake Rassnitzer, Germany)[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2009, 32(8): 571-582
- [11] Yoshinaga I, Amano T, Yamagishi T, et al. Distribution and diversity of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria in the sediment of a eutrophic freshwater lake, Lake Kitaura, Japan[J]. Microbes and Environments, 2011, 26(3): 189-197
- [12] Shen LD, Liu S, Lou LP, et al. Broad distribution of diverse anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in Chinese agricultural soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 6167-6172
- [13] Yang XR, Li H, Nie SA, et al. Potential contribution of anammox to nitrogen loss from paddy soils in Southern China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(3): 938-947
- [14] Wang TT. Community structure and diversity of anammox bacteria in cow manure compost[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2016 (in Chinese)
王婷婷. 牛粪堆肥中厌氧氨氧化菌的群落结构和多样性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2016
- [15] Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete[J]. Nature, 1999, 400(6743): 446-449
- [16] Devol AH. Nitrogen cycle: Solution to a marine mystery[J]. Nature, 2003, 422(6932): 575-576

- [17] Wang SY, Zhu GB, Peng YZ, et al. Anammox bacterial abundance, activity, and contribution in riparian sediments of the Pearl River estuary[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(16): 8834-8842
- [18] Schubert CJ, Durisch-kaiser E, Wehrli B, et al. Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika)[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(10): 1857-1863
- [19] Xu LY, Zhao X, Zhuang LJ, et al. Community structure analysis of anaerobic ammonium oxidation bacteria in wetland sediments based on hydrazine synthase β -subunit[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37(12): 4636-4645 (in Chinese)
徐栎亚, 赵雪, 庄林杰, 等. 基于 *hzsB* 功能基因研究典型湿地沉积物中厌氧氨氧化细菌的群落结构[J]. *环境科学学报*, 2017, 37(12): 4636-4645
- [20] Wu JP, Hong YG, Guan FJ, et al. A rapid and high-throughput microplate spectrophotometric method for field measurement of nitrate in seawater and freshwater[J]. *Scientific Reports*, 2015, 6: 20165
- [21] Guan FJ, Hong YG, Wu JP, et al. A fast sodium hypobromite oxidation method for the sequential determination of ammonia nitrogen in small volume[J]. *Ecological Science*, 2017, 36(2): 42-48 (in Chinese)
关凤杰, 洪义国, 吴佳鹏, 等. 发展一种小体系连续快速测定海洋水体溶解性铵盐的方法[J]. *生态科学*, 2017, 36(2): 42-48
- [22] Han P, Huang YT, Lin JG, et al. A comparison of two 16S rRNA gene-based PCR primer sets in unraveling anammox bacteria from different environmental samples[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(24): 10521-10529
- [23] Wu JP, Hong YG, He X, et al. Anaerobic ammonium oxidation in acidic red soils[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2142
- [24] Humbert S, Zopfi J, Tarnawski SE. Abundance of anammox bacteria in different wetland soils[J]. *Environment Microbiopgyl Report*, 2012, 4(5): 484-490
- [25] Han P, Gu JD. More refined diversity of anammox bacteria recovered and distribution in different ecosystems[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(8): 3653-3663
- [26] Wu JP, Hong YG, Chang XY, et al. Unexpectedly high diversity of anammox bacteria detected in deep-sea surface sediments of the South China Sea[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2019, 95(3): fiz013
- [27] Schmid MC, Risgaard-Petersen N, van de Vossenberg J, et al. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(6): 1476-1484
- [28] Hirsch MD, Long ZT, Song B. Anammox bacterial diversity in various aquatic ecosystems based on the detection of hydrazine oxidase genes (*hzsA/hzsB*)[J]. *Microbial Ecology*, 2011, 61(2): 264-276
- [29] Yan YW, Zhang DM. Multiplicity and heterogeneity of 16S rRNA genes in prokaryotes — a mini review[J]. *Journal of Biology*, 2013, 30(4): 63-66 (in Chinese)
阎永伟, 张德民. 原核生物 16S rRNA 基因多重拷贝及其序列异化[J]. *生物学杂志*, 2013, 30(4): 63-66