

## 校庆优秀校友专栏:生物

## 夏季珠江口冲淡水对氨氧化古菌的空间演替及分布规律的影响

荆红梅<sup>1,2,3</sup>,周鹏<sup>1</sup>,张玥<sup>1</sup>,刘皓<sup>1</sup>,刘红斌<sup>4</sup>

(1.中国科学院 深海科学与工程研究所,海南 三亚 572000;2.南方海洋科学与工程广东省实验室(珠海),广东 珠海 519082;3.中国科学院 三亚海洋科学综合实验室,海南 三亚 572000;  
4.香港科技大学 海洋科学系,香港 999077)

**摘要:**氮在海洋生物地球化学循环中起着重要的作用,通常能限制海洋生物的生产力.硝化反应是氮循环的核心环节,且氨氧化反应是硝化作用的限速步骤,再加上氨氧化古菌(Ammonia Oxidizing Archaea, AOA)是氨氧化反应的主力军,因此海洋氨氧化古菌成了研究热点.通过对夏季珠江口的不同深度水体进行研究,以氨氧化古菌的功能基因氨单加氧酶(*amoA*)作为分子标记,运用 454 高通量测序技术和定量 PCR 在 DNA 和 cDNA 水平上来分析氨氧化古菌的群落结构组成、多样性和基因丰度分布特征.结果表明,夏季珠江口的淡水来源站位(A2B)有着最高的氨氧化古菌群落多样性,但丰度最低;自由生活型的氨氧化古菌丰度是附着生活型的 10~1 000 倍,这可能是氨氧化古菌的主要生存策略;盐度是影响夏季珠江口氨氧化古菌群落结构组成的主要环境因子,而其 *amoA* 基因丰度与环境因子之间没有显著性差异;表层和底层 AOA 群落之间的差异较自由生活的与附着的群落之间更为明显.研究表明在 cDNA 水平上对功能微生物类群进行探究的必要性,有助于增进水体氨氧化古菌群落响应环境变迁的认识.

**关键词:**氨氧化古菌;*amoA* 基因;珠江口;16S rRNA

**中图分类号:**P7;Q93

**文献标志码:**A

氮是所有生物生命活动的必需元素,氮循环的相关研究是国内外学者关注的热点.硝化作用是氮循环的一个核心环节,包括  $\text{NH}_4^+$  到  $\text{NO}_2^-$  (氨氧化)以及  $\text{NO}_2^-$  到  $\text{NO}_3^-$  (亚硝酸氧化)两步氧化反应过程,主要由不同的微生物类群完成.有氧氨氧化是硝化作用的限速过程,主要由氨氧化细菌和氨氧化古菌(Ammonia Oxidizing Archaea, AOA)驱动,因此该类群的组成分布受到科学家们的广泛关注.

氨氧化古菌广泛分布于海洋、湿地、土壤、温泉等自然生境中,在地球氮循环中起了关键作用.AOA 主要属于亚硝化暖菌属(*Nitrosocaldus*),其中海洋、大多数水体以及沉积物来源的 AOA 聚类于 Group 1.1a(A)分支;土壤以及其他陆地生态系统的 AOA 聚类于 Group 1.1b(B)分支;嗜热 AOA 在 *amoA* 系统发育树上形成了一个独特的进化分支.AOA 在低  $\text{NH}_4^+$  和寡营养环境中占主导地位,并表现出对  $\text{NH}_4^+$  极高的亲和性<sup>[1]</sup>.其适宜生长的 pH 范围为 6.8~8.1,盐度范围为 25‰~32‰,且均表现出一定的光抑制现象<sup>[2]</sup>.研究表明盐度是影响海洋 AOA 群落结构的关键因素,其次是温度和辐射度<sup>[3]</sup>.

研究者主要采用 16S rRNA 基因分析方法进行不同环境样品中 AOA 的丰度以及系统发育分析<sup>[4]</sup>.但该

收稿日期:2023-01-01;修回日期:2023-04-06.

基金项目:国家重点研发计划(2022YFC2805505;2022YFC2805304).

作者简介(通信作者):荆红梅(1977—),女,河南新乡人,中国科学院深海科学与工程研究所研究员,研究方向为海洋微生物分子生态学,E-mail:hmjing@idsse.ac.cn.

基因过于保守,甚至不同群落的 16S rRNA 基因相似性能达 97% 以上,所以很难将 AOA 的不同种属在 16S rRNA 基因水平上区分开来<sup>[5]</sup>.随着分子生物学技术的发展以及对 AOA 的深入研究,发现了氨氧化过程中的关键酶—氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, AMO).该酶是由 *amoA*、*amoB*、*amoC* 基因分别编码的  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  3 个亚基组成的三聚体膜结合蛋白,属于单加氧蛋白家族<sup>[6]</sup>.相比较 16S rRNA 基因作为分子标记,编码  $\alpha$  亚基的 *amoA* 基因具有较强的保守性和明显的专一性,在相近的群落之间具有高分辨率,并且具有功能基因特性,因而在氨氧化古菌的遗传多样性分析方面具有优势,常被作为研究 AOA 的分子标记<sup>[7]</sup>.

目前利用 AOA 功能基因 *amoA* 和 qPCR 技术来研究不同生境中 AOA 的基因丰度分布特征的报道较多,包括中国内蒙古草地、东北的海河、珠江口到南海的沉积物、日本海、北太平洋加利福尼亚海湾和蒙特利海湾等.不同水体环境中的 AOA *amoA* 基因丰度也不同.通常海水样品中的 AOA *amoA* 基因拷贝数介于  $10^3 \sim 10^8$  copies/L 之间;且表层海水的丰度普遍低于透光层区域;不同营养类型湖泊中基因拷贝数为  $7.80 \times 10^4 \sim 1.34 \times 10^6$  copies/L<sup>[8]</sup>,珠江底泥中的拷贝数为  $9.60 \times 10^9 \sim 5.10 \times 10^{10}$  copies/kg<sup>[3]</sup>.

珠江年径流量约 3 492 亿  $m^3$ ,仅次于长江,是黄河年径流量的 6 倍.全长 2 320 km,流域面积约 44 万  $km^2$ ,且 4 至 9 月的径流量占全年的 80%.珠江口是三角洲网河和残留河口湾并存的河口,径流大,潮差小,含沙量相对较小,河口区河汊发育,水网密布<sup>[3]</sup>.此外,珠江口夏季受冲淡水影响明显,流速大.目前对于珠江口 AOA 的研究表明其在水体中的丰度通常高于氨氧化细菌<sup>[9]</sup>,以 Shallow group 簇和 SCM1-like 簇样亚系为优势类群,且在 DNA 水平上的整体类群组成与 cDNA 水平上活跃参与氨氧化过程的类群具有明显差异<sup>[10]</sup>.同时 AOA 在较大的颗粒有机物上表现出更高的转录活性<sup>[11]</sup>.为了深入了解夏季珠江口冲淡水对功能微生物类群的影响,利用新一代高通量测序技术和荧光定量 PCR(qPCR)技术研究了夏季珠江口不同盐度、不同深度及不同过滤孔径(0.22  $\mu m$  代表自由生活的;3  $\mu m$  代表附着的)的各水体样品中的 AOA 群落结构组成以及丰度分布特征.此外,在 DNA 和 cDNA 水平上进行了比较研究,解析了关键的生态因子,系统阐述径流输入对 AOA 的群落演替的影响.

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集

珠江口夏季海水样品借助厦门大学航次于 2014 年 7 月 9 日至 26 日采集.共包括 9 个站位(图 1):A02、A04、A06、A08、A10、A12、A14、A16、A18.每个站位的表层及底层海水经 3  $\mu m$  和 0.22  $\mu m$  的聚碳酸酯滤膜来分级过滤,以收集附着生活(3  $\mu m$ , attached)的和自由生活(0.22  $\mu m$ , free-living)的微生物类群.滤膜放入加有 500  $\mu L$  RNAlater 的冻存管中并立即冻入液氮罐中,回到实验室后保存于  $-80$   $^{\circ}C$  超低温冰箱中.

### 1.2 核酸提取,PCR 扩增与测序

滤膜上的 DNA 采用 Genomic DNA Mini Kit 试剂盒提取,RNA 采用 PureLink<sup>TM</sup> RNA Mini Kit 试剂盒提取,然后第一链 cDNA 采用 SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand 试剂盒合成.利用含 MID 的特异性引物对 *amoA*F 和 *amoA*R 扩增 AOA *amoA* 基因序列<sup>[12]</sup>.用无菌水作为反应的阴性对照.DNA 使用 1  $\mu L$  为模板,cDNA 使用 3  $\mu L$  为模板;每个 PCR 的反应体系总体积为 20  $\mu L$ .PCR 反应程序为:95  $^{\circ}C$  预变性 5 min;95  $^{\circ}C$  变性 45 s,53  $^{\circ}C$  退火 1 min,72  $^{\circ}C$  延伸 1 min,运行 35 个循环;最后 72  $^{\circ}C$  延伸 7 min,保存在 4  $^{\circ}C$ .PCR 产物用质量分数 1.2% 的琼脂糖凝胶进行检测,以 100 bp Ladder 为 DNA 标准 Marker.PCR 产物经纯化后,使用 Roche GS Junior 测序平台进行高通量测序.

### 1.3 实时荧光定量 PCR

AOA *amoA* 基因的定量 PCR 反应采用 *amo196F* 和 *amo277R*<sup>[8]</sup> 为引物,利用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 试剂盒,在 ABI 7500 Fast 定量 PCR 仪上进行.每个 qPCR 的反应体系为 10  $\mu L$ ,其中 1  $\mu L$  DNA 或 cDNA 为模板,并使用无菌水作为阴性对照,每个样品和质粒均做 3 个平行.实时定量 PCR 反应程序为:95  $^{\circ}C$  预变性 10 min;95  $^{\circ}C$  变性 15 s,60  $^{\circ}C$  延伸 1 min,45 个循环;然后进行溶解曲线检测阶段,荧光取值在 60  $^{\circ}C$  和溶解曲线全程.利用梯度稀释的质粒( $10^{-8} \sim 10^{-1}$ )分别作为模板进行 qPCR,并用其分别对应的 Ct 值和基因拷贝数来构建标准曲线( $R^2 = 0.990 6$ ,扩增效率为 102.16%),然后将样品(DNA、cDNA)通过

qPCR 获得的 Ct 值分别代入标准曲线中进行计算,最后用 SigmaPlot 对数据进行绘图。

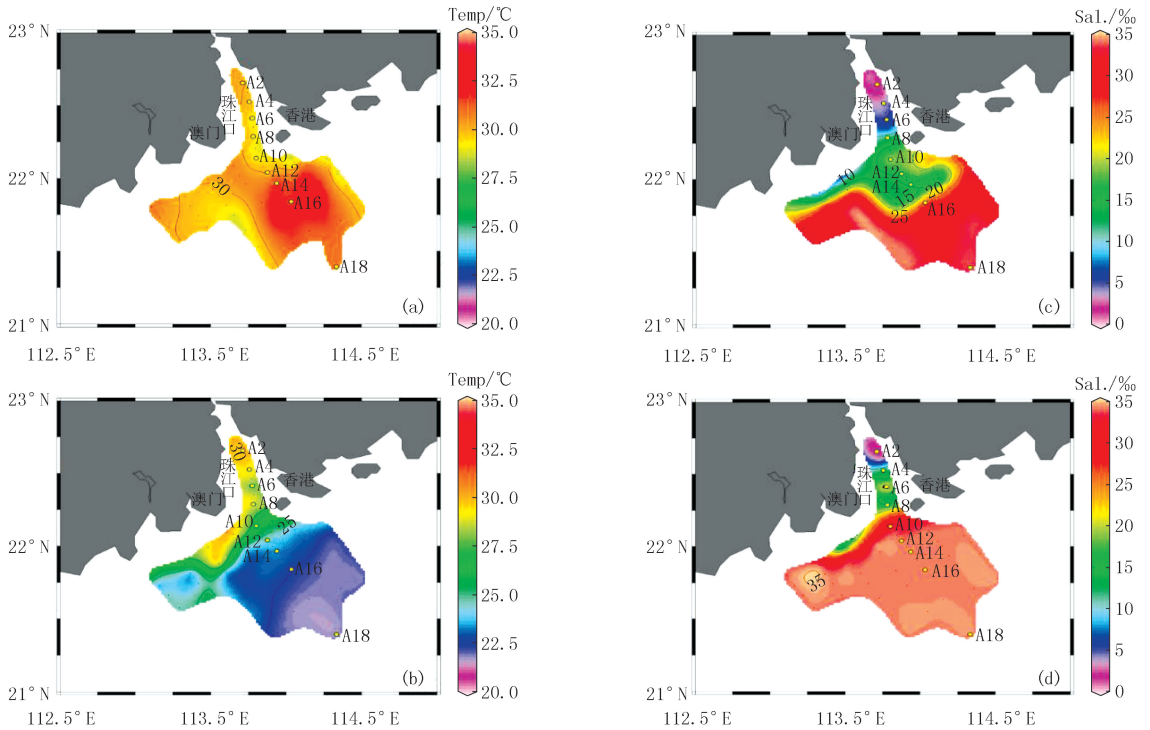


图1 夏季珠江口各采样站位的温度(a, 表层;b, 底层)和盐度(c, 表层;d, 底层)示意图

Fig.1 Temperature(a, surface;b, bottom) and salinity(c, surface;d, bottom) in the Pearl River Estuary in summer

#### 1.4 生物信息学分析

通过 Roche GS Junior 平台所获得的 AOA *amoA* 基因原始序列利用 mothur 软件(<http://www.mothur.org/>)进行初步筛选和去杂,将引物以及测序标签的错配碱基数大于 1 的序列去除,同时将总序列长度小于 300 bp 的序列去除,随后去除含有嵌合体的序列,最终形成一个 shared 文件.利用 mothur 的 get.oturep 命令基于 97% 的序列相似度得到各个 OTU 的代表序列名.随后,按照样品最低序列为标准对数据进行均一化处理.利用 Primer 5 进行多样性指数分析,主要包括群落丰富度指数(Margalef)、均匀度指数、香农指数、辛普森指数等,其计算公式分别为: $d[\text{Species Richness (Margalef)}] = (S - 1) / \ln(N)$ ,  $J'(\text{Pielou's Evenness}) = H' / \ln(S)$ ,  $H'(\text{Shannon}) = -\sum_i [P_i \times \ln(P_i)]$ ,  $1 - \lambda(\text{Simpson}) = 1 - \sum_i [N_i \times (N_i - 1) / N \times (N - 1)]$ ,其中  $S$  为群落总 OTU 数,  $N$  为总序列数,  $P_i$  为第  $i$  个 OTU 在整个序列中所占的比例,  $N_i$  为第  $i$  个 OTU 的个体数.各站位序列覆盖度(Coverage,  $C$ )是利用 mothur 软件的 summary.single 命令基于 97% 的序列相似度对氨氧化古菌 *amoA* 基因序列进行计算的,其计算公式为  $C = [1 - (n_1 / N)]$ ,其中  $n_1$  为序列中仅有一条序列的 OTU 数,  $N$  为序列的总 OTU 数。

利用 mothur 软件进行样品间相似度的聚类分析,其中非度量多维尺度分析(NMDS)利用 Primer 5<sup>[13]</sup>完成.此外,还利用 mothur 的 tree.shared 命令基于布雷柯蒂斯(Bray-Curtis)距离进行样品间的非加权组平均法(UPGMA)聚类分析。

挑选丰度较高的 OTUs(总序列数大于 20)进行系统发育分析.先将这些 OTUs 的代表序列上传到 NCBI 的 GenBank 数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)做 blastn 比对,并下载参考序列.基于 ClustalW 进行序列比较,并切除两端不匹配的序列,然后利用 Mega 6<sup>[14]</sup>的 Models 进行模型预测.挑选出最优的模型 General Time Reversible,利用最大似然法(Maximum Likelihood)进行 Bootstrap 值为 1 000 的系统发育树构建。

#### 1.5 统计学分析

利用 CANOCO V5.0 对氨氧化古菌的群落结构组成和环境因子之间进行冗余分析(RDA);并利用 SPSS 20 对 *amoA* 基因丰度和主要类群与环境因子之间分别进行两两之间的 Spearman 相关性分析,以确定

达到极显著水平( $p < 0.01$ )或显著水平( $p < 0.05$ )的环境生态因子。

## 1.6 基因序列的提交号

将获得的原始序列提交至 NCBI 数据库,获得序列号 PRJNA948716。

## 2 结果与讨论

### 2.1 氨氧化古菌群落多样性

夏季珠江口的表层及底层的温盐差异非常明显(图 1)。从珠江河口 A2 一直到外海 A18 的断面的盐度差异尤其明显,包括了全淡水环境到淡海水交汇环境最后到全海水环境(图 1)。

每个站位的样品序列的覆盖度均达到了 0.99(表 1),且稀释曲线随测序量增加而逐步达到饱和,均显示了测序深度足够反映样品的多样性。

表 1 夏季珠江口氨氧化古菌 *amoA* 基因测序信息

Tab. 1 Sequencing information of AOA *amoA* gene in the Pearl River Estuary in summer

Samples	Quality Reads	No. of OTUs	Species Richness	Pielou's Evenness	Shannon	Simpson	Coverage/%
A2B-0.22	3 119	52	6.34	0.56	2.22	0.81	99.90
A6B-0.22	5 483	11	1.16	0.09	0.22	0.07	99.96
A8B-0.22	2 844	28	3.40	0.45	1.50	0.71	99.68
A10B-3	1 937	11	1.32	0.17	0.41	0.20	99.90
A10S-0.22	10 871	9	0.86	0.35	0.76	0.47	99.96
A10B-0.22	9 402	9	0.87	0.07	0.15	0.06	99.98
cA10B-0.22	8 133	24	2.56	0.36	1.16	0.61	99.90
A12B-3	1 612	20	2.57	0.23	0.70	0.35	99.38
A12S-0.22	7 931	12	1.23	0.46	1.16	0.61	99.94
A12B-0.22	10 470	23	2.38	0.11	0.35	0.17	99.91
cA12B-0.22	5 329	22	2.45	0.31	0.96	0.54	99.85
A14S-0.22	679	17	2.45	0.14	0.41	0.13	98.82
A14B-0.22	8 068	15	1.56	0.15	0.40	0.21	99.89
cA14B-0.22	6 774	20	2.15	0.33	1.00	0.59	99.85
A16B-0.22	8 074	19	2.00	0.17	0.51	0.28	99.90
cA16B-0.22	8 093	24	2.56	0.30	0.95	0.53	99.89
A18B-3	1 092	6	0.71	0.34	0.62	0.40	99.73
A18S-0.22	1 296	26	3.49	0.30	0.96	0.37	99.23
A18B-0.22	9 420	38	4.04	0.22	0.81	0.45	99.90
cA18B-0.22	7 900	31	3.34	0.29	0.99	0.56	99.84

注: B, bottom; S, surface; c, cDNA; 3, 3  $\mu\text{m}$ (attached); 0.22, 0.22  $\mu\text{m}$ (free-living)。

总体而言,夏季珠江口各站位 AOA 的 OTUs 偏低,数目最多的 A2B-0.22 拥有 52 个 OTUs,而 A18B-3 仅含有 6 个 OTUs(表 1)。其次,底层样品的 OTUs 数目高于表层;cDNA 样品的 OTUs 数目高于 DNA,结果与之前的研究相似<sup>[10]</sup>。主要是淡水来源的 A2B 站位含有最大的 OTU 数(52),同时也有最大的群落丰富度指数(6.34)、均匀度指数(0.56)、香农指数(2.22)和辛普森指数(0.81)(表 1)。生物群落的多样性反映了生物群落的丰富度以及各个类群的相对比例。群落丰富度指数(Margalef)越高,说明此环境中生物群落的种类越丰富;对于均匀度指数  $J'$ (Pielou's Evenness)来说,指数越高说明在此环境中各群落的分布均一性越好;辛普森指数代表了群落优势度,其值越高说明群落在此环境种类越丰富;香农指数则是综合考虑了群落丰富度和均匀度的一个群落多样性指数,其指数值越高,则反映在此环境中群落多样性越高。基于各个参数,大概得出以下结论:(1)盐度较低的站位(例如 A2、A4、A6 和 A8),AOA 的群落多样性显著高于其他盐度较高的站

位( $p < 0.05$ );(2)同一研究站位,表层来源的 AOA 群落多样性高于底层;(3)通过 DNA 水平和 cDNA 水平的比较,发现 cDNA 水平上的群落多样性反而高于 DNA 水平;(4)cDNA 水平的均匀度指数高于 DNA 水平,说明 AOA 的一些丰度较低的物种却具有极强的转录活性或者一些丰度较高的物种具有极低的转录活性,如丰度最高的 OTU1 在 DNA 水平上的相对比例为 68%~97%,cDNA 水平上为 48%~60%;而 OTU2 在 DNA 水平上的相对比例为 2%~27%,cDNA 水平上为 25~45%.cDNA 水平上更为直观地反映了活跃代谢的微生物类群,能增加人们对于微生物群落组成和分布及生态功能的全面认识,如之前在珠江口的研究发现某些 SCM1-like 簇亚系的高转录活性<sup>[10]</sup>.此外,转录水平上的结果还需要结合其他研究手段来反映真正的生态功能.

### 2.2 AOA *amoA* 基因的系统发育分析

夏季珠江口的 AOA 主要聚于 7 簇,分别是 Shallow group 簇, Freshwater 簇, SCM1-like 簇, Coastal 簇, Sediment 簇, Deep group 簇, Soil 簇,其中 Shallow group 簇被细分为 Shallow group I 亚簇, Shallow group II 亚簇, Shallow group III 亚簇; Freshwater 簇和 Coastal 簇是本研究中新发现的并分别命名(图 2).

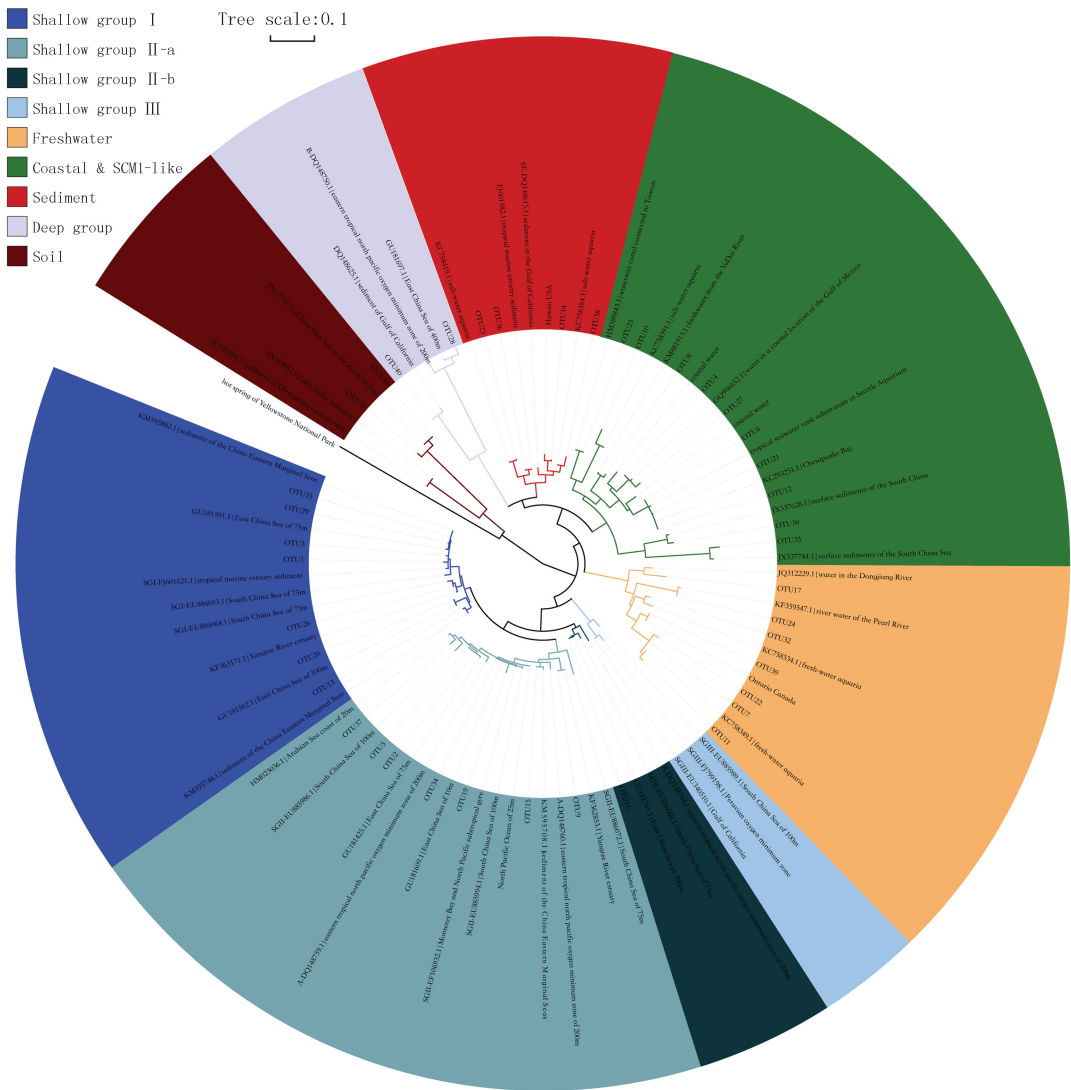


图2 夏季珠江口水体中基于 AOA *amoA* 基因序列前 40 个 OTUs 的最大相似性系统发育树

Fig.2 Maximum-likelihood phylogenetic tree of the AOA *amoA* gene sequences based on the top 40 OTUs obtained from the Pearl River Estuary in summer

Shallow group 簇是夏季珠江口的优势种群,这与之前的研究相一致<sup>[10]</sup>.其中 Shallow group I 亚簇包括 OTU1 和 OTU3 在内共 7 个 OTUs; Shallow group II 亚簇也包含了 8 个 OTUs; Freshwater 簇, SCM1-

like 簇, Coastal 簇, Sediment 簇, Deep group 簇, Soil 簇分别包含 8, 3, 6, 4, 2, 2 个 OTUs. 这些序列绝大多数来源于海洋水体, 少部分序列来自海洋沉积物和陆地生态系统. 其中 Shallow group I 亚簇的同源序列来源于中国东海水体和南海水体、沉积物<sup>[15]</sup>; Shallow group II 亚簇的同源序列来源于扬子江河口<sup>[16]</sup>、东北太平洋的缺氧区<sup>[12]</sup>、东海水体和南海水体及沉积物<sup>[15]</sup>, 同时 CN25 菌株<sup>[17]</sup>也聚集在这个亚簇; Freshwater 簇的同源序列来源于东江水体<sup>[18]</sup>及淡水水族馆<sup>[19]</sup>; Coastal 簇的同源序列包括 2 株海岸分离的纯菌 (PS0 和 HCA1)<sup>[2]</sup>和来自墨西哥海湾、南海表面沉积物<sup>[16]</sup>的环境样品序列; Sediment 簇的同源序列来源于夏威夷珊瑚礁保护区沉积物、加利福尼亚湾沉积物<sup>[12]</sup>; Deep group 簇的同源序列来源于东北太平洋缺氧区、加利福尼亚湾沉积物<sup>[9]</sup>和东海水体<sup>[15]</sup>; Soil 簇的同源序列来源于崇明岛东滩湿地<sup>[20]</sup>、太湖沉积物<sup>[21]</sup>和东海水体<sup>[15]</sup>.

### 2.3 氨氧化古菌群落结构组成

通过对得到的总计 185 个 OTUs 进行分类鉴定, 获得珠江口夏季 AOA 的群落结构组成信息 (图 3).

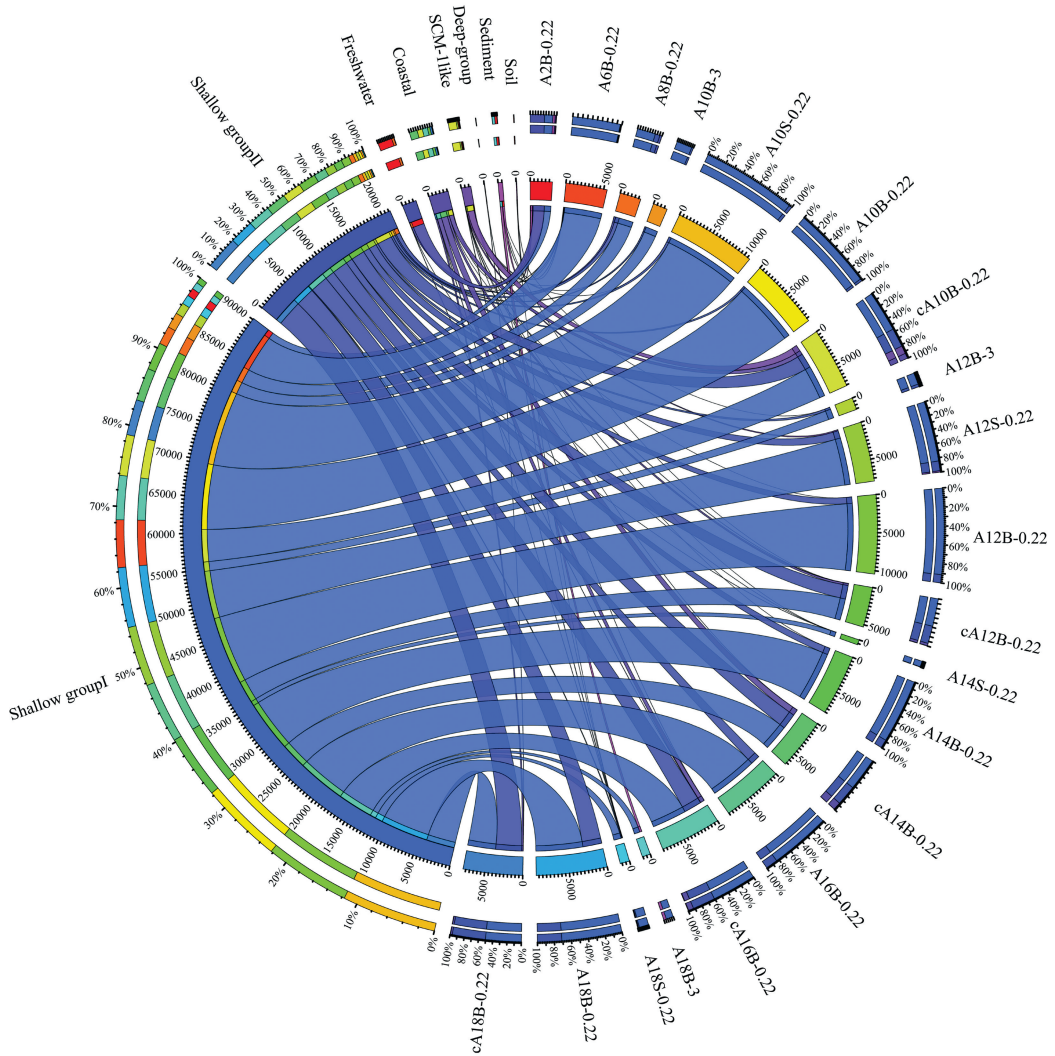


图3 夏季珠江口水体中氨氧化古菌的群落结构组成图

Fig.3 Community structure of AOA in the waters of Pearl River Estuary in summer

除 A2B-0.22 样品外, 其他样品都被 Shallow group I 亚簇主导, 而 A2B-0.22 样品的 AOA 来源主要是 Freshwater 簇, 其中底层样品来源的 OTU1 和表层样品来源的 OTU3 分别在其对应的群落结构组成中占据着较大比例, 而 OTU1 和 OTU3 在系统进化树上均属于 Shallow group I 亚簇. 在 Tara Oceans 的研究

中,Shallow group I 亚簇在全球海洋的表层 AOA 群落中占主要地位<sup>[22]</sup>,这表明 Shallow group I 亚簇更适合此水域的环境,正如其代表性培养种(*Candidatus Nitrosopelagicus brevis* CN25)的基因组和蛋白质组学所揭示的结果,Shallow group I 亚簇具有高编码密度和普遍分布于寡营养表层海洋的流线型基因组<sup>[23]</sup>.通过对同一站位样品 DNA 和 cDNA 水平上进行比较,Shallow group II 亚簇在 cDNA 水平上拥有相对更高的比例;Deep group 簇只在 cA16B-0.22 和 cA18B-0.22 两个样品中存在;且 Soil 簇来源的也主要在 A2B-0.22 样品中发现.本研究的群落结构组成与南海海域 100 m<sup>[15]</sup>的 AOA 群落结构组成极为相似,但本研究中未发现 Shallow group III 亚簇.这可能是由于本研究的采样点集中在珠江口,而 Shallow group III 亚簇主要在南海开放海域中发现所造成的.

## 2.4 氨氧化古菌群落聚类分析

通过 NMDs 和 UPGMA 两种聚类分析,样品间的相似性聚类表现出了几乎一致的结果(图 4):除淡水来源 A2B 站位和盐度相对较低的 A8B 站位外,所有底层海水来源的 0.22  $\mu\text{m}$ (free-living)样品聚集在一起;表层海水来源的 free-living 样品聚集在一起;而底层海水来源的 3  $\mu\text{m}$ (attached)样品聚集在一起,说明表层和底层来源的 AOA 差异较明显.自由生活的与附着的 AOA 群落之间也存在着一定的差异,但相对于表层和底层之间的差异较小.

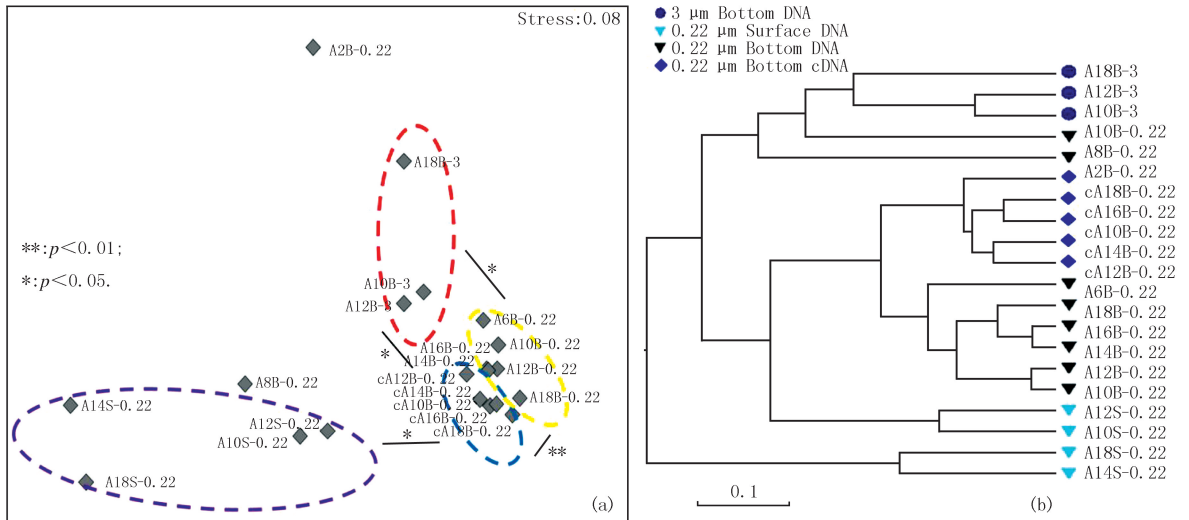


图4 夏季珠江口水体样品间NMDs分析(a)和UPGMA聚类分析(b)

Fig. 4 NMDs plot(a) and UPGMA clustering(b) for samples collected from Pearl River Estuary in summer

## 2.5 氨氧化古菌的 *amoA* 丰度分布

利用标准曲线分别计算自由生长和附着生长的 AOA *amoA* 基因拷贝数(图 5).自由生活(0.22  $\mu\text{m}$ )的 AOA *amoA* 在 DNA 水平上层拷贝数为  $2.31 \times 10^2 \sim 2.76 \times 10^5$  copies/L,其中 A2、A8、A16 站位未检出;底层 AOA *amoA* 基因拷贝数为  $3.40 \times 10^3 \sim 1.81 \times 10^6$  copies/L;而底层 cDNA 水平上 AOA *amoA* 基因拷贝数为  $4.66 \times 10^1 \sim 1.73 \times 10^4$  copies/L 且 A2 和 A6 站位未检出.附着生活(3  $\mu\text{m}$ )的 AOA *amoA* 在 DNA 水平上层拷贝数为  $8.57 \times 10^1 \sim 1.98 \times 10^4$  copies/L,其中 A8 站位未检出;表层 cDNA 水平上 AOA *amoA* 基因拷贝数为  $1.93 \times 10^2 \sim 5.87 \times 10^3$  copies/L 且 A2、A8、A16 和 A18 站位未检出;底层 AOA *amoA* 基因拷贝数为  $2.21 \times 10^2 \sim 6.60 \times 10^3$  copies/L;而底层 cDNA 水平上 AOA *amoA* 基因拷贝数为  $1.06 \times 10^2 \sim 5.81 \times 10^3$  copies/L.通过以往的文献报道显示:珠江表层水体中 AOA *amoA* 拷贝数为  $6.27 \times 10^4 \sim 3.63 \times 10^7$  copies/L,而底层水体为  $3.59 \times 10^5 \sim 4.98 \times 10^8$  copies/L<sup>[10]</sup>;不同营养类型湖泊中 AOA *amoA* 基因拷贝数为  $7.80 \times 10^4 \sim 1.34 \times 10^6$  copies/L<sup>[8]</sup>.总体而言,0.22  $\mu\text{m}$  比 3  $\mu\text{m}$  有着更高的 *amoA* 基因丰度;无论是在 0.22  $\mu\text{m}$  孔径还是在 3  $\mu\text{m}$  孔径上,*amoA* 的丰度都有着从河口到外海升高的趋势;而从 DNA 相对于 cDNA 上的占比

看,0.22 μm 孔径上的比值大于 3 μm 孔径,说明自由生活的 AOA *amoA* 基因活性比附着生活的低,表明了 AOA 微生物的生活策略与之前的研究相符<sup>[10]</sup>.在 0.22 μm 孔径上,底层的样品的 *amoA* 基因丰度远远大于表层.

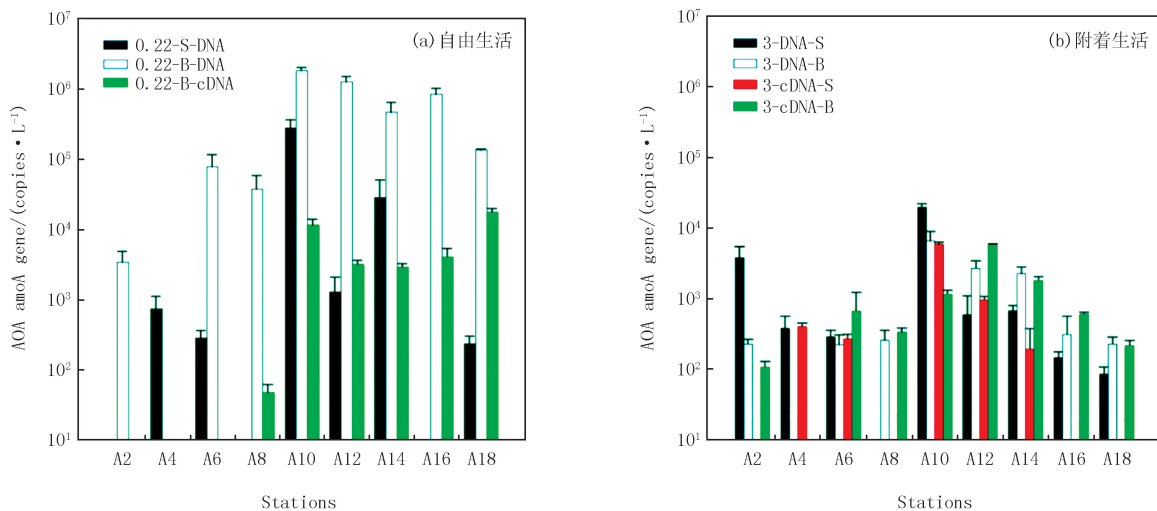


图5 夏季珠江口AOA *amoA*基因丰度及分布

Fig.5 Gene abundances of AOA *amoA* in the Pearl River Estuary in summer

### 2.6 相关性分析

RDA 分析表明夏季珠江口氨氧化古菌群落组成受到温度和盐度显著影响.Spearman 相关性分析显示,温度与盐度及 Shallow group II 亚簇呈极显著负相关( $p < 0.01$ );盐度与 Shallow group II 亚簇呈极显著正相关( $p < 0.01$ ),而与 SCM1-like 簇呈负相关( $p < 0.05$ );但温度和盐度均未与 *amoA* 基因丰度显示出任何相关性(表 2).以往对珠江口河口到南海沉积物中氨氧化微生物的研究也证明了盐度是影响 AOA 群落结构的关键因素,且 AOA 的丰度与 pH 和温度呈正相关<sup>[3]</sup>;珠江口沉积物中的 AOA 丰度与盐度相关,且盐度越低丰度更高<sup>[24]</sup>.而本研究发现 AOA *amoA* 基因丰度随着盐度降低而降低,这可能是本研究聚焦于海水样品所造成的差异,且河口系统中 AOA 的 *amoA* 基因丰度不仅仅受盐度因子的调节,同时还会受到温度、无机营养盐浓度和溶解氧的组合控制<sup>[11]</sup>.

表 2 夏季珠江口氨氧化古菌群落组成、丰度与环境因子之间的 Spearman 相关性分析

Tab. 2 Spearman analysis among AOA community composition, abundance and environmental factors in the Pearl River Estuary in summer

R value	T	S	SG I	SG II	Freshwater	Coastal	SCM1-like	DG	Sediment	Soil
S	0.938 **									
SG I	-0.260	0.172								
SG II	-0.672 **	0.587 **	0.441							
Freshwater	0.340	-0.440	-0.408	-0.205						
Coastal	-0.336	0.276	-0.099	0.392	0.034					
SCM1-like	0.352	-0.473 *	-0.247	-0.176	0.152	0.354				
DG	-0.424	0.424	0.026	0.494 *	0.207	0.408	-0.358			
Sediment	0.232	-0.108	-0.539 *	-0.589 **	0.032	0.151	0.238	-0.214		
Soil	0.100	-0.178	-0.281	-0.503 *	0.230	0.275	0.491 *	-0.139	0.677 **	
Abundance	-0.222	0.089	0.845 **	0.337	-0.128	-0.107	-0.335	0.032	-0.458 *	-0.162

注: \*\* 表示  $p < 0.01$ ; \* 表示  $p < 0.05$ . T, temperature; S, salinity; SG I, Shallow group I; SG II, Shallow group II; DG, Deep group.



### 3 结 论

通过对夏季珠江口氨氧化古菌的群落结构及丰度分布进行研究,研究结论如下:(1)主要是淡水来源的 A2 站位有着最大的 AOA 群落多样性但有最低的 *amoA* 丰度,且群落结构组成主要是 Freshwater 簇占主导;(2)除 A2 站位外,其他样品均被 Shallow group I 亚簇主导,而 Shallow group II 亚簇有着更高的转录活性;(3)AOA *amoA* 基因丰度在底层样品中明显高于表层,且 free-living 的 AOA 丰度比 attached 高 10~1 000 倍;(4)Shallow group II 亚簇与温度存在极显著负相关,但其和 SCM1-like 簇与盐度存在着显著正相关。

### 参 考 文 献

- [1] WUCHTER C, ABBAS B, COOLEN M J, et al. Archaeal nitrification in the ocean[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(33): 12317-12322.
- [2] QIN W, AMIN S A, MARTENS-HABBENA W, et al. Marine ammonia-oxidizing archaeal isolates display obligate mixotrophy and wide ecotypic variation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(34): 12504-12509.
- [3] CAO H L, HONG Y G, LI M, et al. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing prokaryotes in sediments from the coastal Pearl River Estuary to the South China Sea[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2011, 100(4): 545-556.
- [4] KOWALCHUK, STIENSTRA, HEILIG, et al. Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A(The Netherlands)[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2000, 31(3): 207-215.
- [5] FOX G, WISOTZKEY J, JURTSCHUK P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity[J]. Int J Syst Bacteriol, 1992, 42(1): 166-170.
- [6] HOLMES A J, COSTELLO A, LIDSTROM M E, et al. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 132(3): 203-208.
- [7] ROTTHAUWE J H, WITZEL K P, LIESACK W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(12): 4704-4712.
- [8] 王文玲. 氨氧化古菌的丰度与水体营养水平的关系研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2011.  
WANG W L. Study on the relationship between the abundance of ammonia-oxidizing Archaea and the nutritional level of water body[D]. Wuhan: Central China Normal University, 2011.
- [9] HOU L, XIE X B, WAN X H, et al. Niche differentiation of ammonia and nitrite oxidizers along a salinity gradient from the Pearl River Estuary to the South China Sea[J]. Biogeosciences, 2018, 15(16): 5169-5187.
- [10] LU Y H, CHEUNG S, CHEN L, et al. New insight to niche partitioning and ecological function of ammonia oxidizing Archaea in subtropical estuarine ecosystem[J]. Biogeosciences, 2020, 17(23): 6017-6032.
- [11] MA L, TAN S, LIU H, et al. Distribution and activity of ammonia-oxidizers on the size-fractionated particles in the Pearl River estuary[J]. Front Mar Sci, 2021, 8: 685955.
- [12] FRANCIS C A, ROBERTS K, BEMAN J, 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, 2005, 102(41): 14683-14688.
- [13] CLARKE K R, WARWICK R M. PRIMER v5: user manual/tutorial[M]. [S.l.]: Primer-E Limited, 2001.
- [14] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [15] ZHANG Y, XIE X, JIAO N, et al. Diversity and distribution of *amoA*-type nitrifying and *nirS*-type denitrifying microbial communities in the Yangtze River Estuary[J]. Biogeosciences, 2014, 11(8): 2131-2145.
- [16] HU A Y, JIAO N Z, ZHANG C L. Community structure and function of planktonic crenarchaeota: changes with depth in the South China Sea[J]. Microbial Ecology, 2011, 62(3): 549-563.
- [17] SANTORO A E, CASCIOTTI K L. Enrichment and characterization of ammonia-oxidizing Archaea from the open ocean: phylogeny, physiology and stable isotope fractionation[J]. The ISME Journal, 2011, 5(11): 1796-1808.
- [18] SUN W, XIA C Y, XU M Y, et al. Community structure and distribution of planktonic ammonia-oxidizing Archaea and bacteria in the Dongjiang River, China[J]. Research in Microbiology, 2014, 165(8): 657-670.
- [19] SAUDER L A, ENGEL K, STEARNS J C, et al. Aquarium nitrification revisited: thaumarchaeota are the dominant ammonia oxidizers in freshwater aquarium biofilters[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23281.
- [20] ZHENG Y L, HOU L J, LIU M, et al. Diversity, abundance, and activity of ammonia-oxidizing bacteria and Archaea in Chongming eastern

- intertidal sediments[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(18): 8351-8363.
- [21] WU Y C, KE X B, HERNÁNDEZ M, et al. Autotrophic growth of bacterial and archaeal ammonia oxidizers in freshwater sediment microcosms incubated at different temperatures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(9): 3076-3084.
- [22] CHEUNG S, MAK W, XIA X M, et al. Overlooked genetic diversity of ammonia oxidizing Archaea lineages in the global oceans[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2019, 124(7): 1799-1811.
- [23] SANTORO A, DUPONT C, RICHTER R, et al. Genomic and proteomic characterization of "Candidatus Nitrosopelagicus brevis": An ammonia-oxidizing archaeon from the open ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(4): 1173-1178.
- [24] JIN T, ZHANG T, YE L, et al. Diversity and quantity of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in sediment of the Pearl River Estuary, China[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(3): 1137-1145.

## Community structures and activities of ammonia oxidizing archaea influenced by runoff input of Pearl River Estuary during summer

Jing Hongmei<sup>1,2,3</sup>, Zhou Peng<sup>1</sup>, Zhang Yue<sup>1</sup>, Liu Hao<sup>1</sup>, Liu Hongbin<sup>4</sup>

(1. Institute of Deep-sea Science and Engineering, Chinese Academy of Sciences, Sanya 572000, China; 2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhuhai), Zhuhai 519082, China; 3. HKST Sanya Joint Laboratory of Marine Science Research, Chinese Academy of Sciences, Sanya 572000, China; 4. The Department of Ocean Science, The Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong 999077, China)

**Abstract:** Nitrification is the core part of the nitrogen cycle and ammonia oxidation is the rate-limiting step of nitrification, therefore, ammonia oxidizing archaea (AOA) as the main force of ammonia oxidation reaction has become a research hotspot. With AOA *amoA* gene as the molecular marker, this study uses 454 pyrosequencing and quantitative PCR with seawater collected from the Pearl River Estuary during summer with runoff input to investigate the community structures and activities of free-living and attached AOA communities at both DNA and cDNA levels. In summer, the station of mainly freshwater source (A2B) in the Pearl River Estuary had the highest AOA community diversity but the lowest *amoA* gene abundances. The abundance of free-living AOA was 10-1 000 times higher than those attached ones. Salinity was the main environmental factor affecting the community structures of AOA, however, there was no significant relationship between the environmental factors and the AOA *amoA* gene abundance. Distinct AOA community structures existed between the surface and bottom, and was more obvious than the difference between free-living and attached fractions. This study highlighted the necessity of studying functional groups at the cDNA levels, and provided insight into the influence of environmental variation on the population shifts of AOA in the aquatic ecosystems.

**Keywords:** ammonia oxidizing archaea (AOA); *amoA* gene; Pearl River Estuary; 16S rRNA

[责任编辑 刘洋 杨浦]