DOI: 10.5846/stxb201505070946

刘姣,刘长发,李盛德,李晋,陶韦,李璐瑶,马悦欣.翅碱蓬对盐沼沉积物微生物生物量及β-氨氧化细菌群落的影响——以双台河口为例.生态学报,2016,36(24): - .

Liu J, Liu C F, Li S D, Li J, Tao W, Li L Y, Ma Y X.Effects of *Suaeda heteroptera* on microbial biomass and the community structure of β -ammonia-oxidizing bacteria in salt marsh sediments: The case of the Shuangtai estuary. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(24): -.

翅碱蓬对盐沼沉积物微生物生物量及 β -氨氧化细菌群 落的影响

——以双台河口为例

刘 姣¹,刘长发²,李盛德³,李 晋⁴,陶 韦²,李璐瑶¹,马悦欣^{1,*}

1 农业部海洋水产增养殖学重点开放实验室,大连 116023
2 辽宁省高校近岸海洋环境科学与技术重点实验室,大连 116023

3 大连海洋大学理学院,大连 116023

4 盘锦海洋与水产研究所,盘锦 124010

摘要:为了解翅碱蓬植被对盐沼沉积物微生物的影响,于 2013 年 7 月、8 月、9 月和 11 月对双台河口裸滩和翅碱蓬植被沉积物 (10—15 cm)微生物生物量碳(MBC)、微生物生物量氮(MBN)、16S rRNA 基因丰度、潜在硝化速率 β-氨氧化细菌(β-AOB)丰度 及群落进行了调查。结果表明,不同采样日期裸滩沉积物 MBC、翅碱蓬沉积物 β-AOB amoA 丰度和两种生境潜在硝化速率没有 显著差异;而翅碱蓬沉积物 MBC、裸滩沉积物 β-AOB amoA 丰度、两种生境 MBN 和 16S rRNA 基因丰度呈现时间波动。当所有 采样日期的数据结合分析时,翅碱蓬植被显著影响沉积物 MBC、MBN、细菌 16S rRNA 基因丰度、潜在硝化速率和 β-AOB amoA 丰度。从裸滩和翅碱蓬沉积物获得的 β-AOB 序列属于 Nitrosopira 和 Nitrosomonas,翅碱蓬植被对 β-AOB 群落结构和多样性均 有一定的影响。研究结果有助于了解翅碱蓬湿地中微生物 5,AOB

Effects of *Suaeda heteroptera* on microbial biomass and the community structure of β -ammonia-oxidizing bacteria in salt marsh sediments: The case of the Shuangtai estuary

LIU Jiao¹, LIU Changfa², LI Shengde³, LI jin⁴, TAO Wei², LI Luyao¹, MA Yuexin^{1,*}

Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea of Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China
Key Laboratory of Marine Environmental Research of Liaoning Higher Education, Dalian 116023, China

3 School of Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

4 Institute of Ocean and Fisheries of Panjin, Panjin, 124010, China

Abstract: The goal of this study was to examine the impacts of sedimentary colonization by *Suaeda heteroptera* on benthic microbial biomass carbon (MBC), microbial biomass nitrogen (MBN), 16S rRNA gene abundance, potential nitrification rate, and the richness and community structure of β -ammonia-oxidizing bacteria (β -AOB) in a salt marsh located in Shuangtai, China. Sediment samples (10–15 cm) were collected from a site colonized by *S. heteroptera* and from an

基金项目:国家自然科学基金项目(41171389);国家海洋公益性行业科研专项(201305043);辽宁省高等学校优秀科技人才支持计划 (LR2013035)

收稿日期:2015-05-07; 网络出版日期:2015-00-00

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail:mayuexin@ dlou.edu.cn

http://www.ecologica.cn

adjacent unvegetated mudflat in July, August, September, and November of 2013. No significant differences in MBC were detected in unvegetated sediment among the various sampling dates, whereas MBC in vegetated sediment increased significantly in August and September compared with July (P < 0.05); overall, MBC in vegetated sediment was significantly higher than in unvegetated sediment (P < 0.05). A similar temporal trend was detected for MBN in the two sites, with higher values recorded in August than in July and November (P < 0.05); in addition, MBN in vegetated sediment increased significantly in July, August, and September compared with MBN in unvegetated sediment (P < 0.05). Bacterial 16S rRNA gene abundance, measured using a real-time quantitative PCR technique, was significantly higher in both habitats in July, August, and September than in November (P < 0.05), and was significantly higher in vegetated sediment in August, September, and November than in unvegetated sediment (P < 0.05). No significant differences in potential nitrification rates were detected within the two habitats for any of the sampling dates, but potential nitrification rate increased significantly in vegetated sediment in August and September compared with unvegetated sediment (P < 0.05). The abundance of β -AOB ammonia monocygenase subunit A gene (*amoA*) in unvegetated sediment was significantly higher in August than in September and November (P < 0.05), but no difference was detected in the abundance of β -AOB amoA in vegetated sediment among the different sampling dates. However, β -AOB amoA abundance in vegetated sediment was significantly higher than in unvegetated sediment at all sampling dates (P < 0.05), with the exception of September. When data from all sampling dates were combined, MBN, 16S rRNA gene abundance, potential nitrification rate and abundance of β -AOB amoA were significantly higher in vegetated sediment than in unvegetated sediment (P < 0.05). The community structure of β -AOB was analyzed using the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique. Sequences affiliated with species of Nitrosospira and Nitrosomonas were recovered from the two habitats. Colonization by S. heteroptera influenced the community structure and diversity of β -AOB. These results add to our understanding of the role microorganisms play in sediment dominated by S. heteroptera and provide a reference for the ecological restoration of salt marshes.

Key Words: Suaeda heteroptera; microbial biomass; 16S rRNA gene abundance; nitrification; β -AOB

盐沼在营养转化和滞留中起重要作用。这些生态系统的特点是具有由根贡献大量碳的高净初级生产 力^[1-2]。总碳从植物根转移到沉积物,包括渗出液、分泌物、溶解产物和粘液,影响根附近土壤微生物群落,影 响主要的营养供应和改变沉积物的理化性质^[3]。这些有机质的输入支持密集的微生物群落,盐沼植被沉积 物微生物集合体的丰度和活力显示植物专一的属性^[4]。

Ria de Aveiro 盐沼沉积物上不同盐生植物种类调节细菌群落的丰度、垂直分布和组成。沉积物与植物物种相互作用的物理性质(深度、水分含量、粒径分布)调节细菌总细胞丰度^[5]。Empordù 和 Doñana 湿地挺水性植物影响其根际细菌 16S rRNA 基因丰度^[6]。辽河三角洲湿地不同植被类型土壤微生物中细菌、放线菌和真菌三大类微生物数量以及土壤微生物生物量碳(MBC)分布都表现为表层(0—10 cm)大于其它两层(10—20 cm 和 20—30 cm)。包括翅碱蓬在内的八种植被类型土壤中三大类微生物数量以及土壤 MBC 不同,其中翅碱蓬土壤中放线菌、真菌和 MBC 含量相对较低^[7]。

硝化作用,硝化细菌顺序氧化氨为亚硝酸盐和硝酸盐,在河口和大陆架沉积物它链接有机氮化物的矿化 作用和其最终通过反硝化作用或厌氧氨氧化以气态产物去除^[8]。在位于 Savannah 的 Skidaway 岛的盐沼生态 系统研究设施中高互花米草 Spartina alterniflora 沉积物潜在硝化速率比矮互花米草沉积物的高 10 倍,而无植 被沉积物的潜在硝化速率位于两者之间^[9]。Lucio del Cangrejo 盐沼芦苇 Phragmites australis 根际潜在硝化速 率与无植被沉积物有显著差异^[6]。硝化细菌由系统发育和生理上不同氨氧化细菌(AOB)和亚硝酸氧化细菌 组成。其中由 AOB 催化的氨氧化是硝化作用的限制性步骤,因此前人对盐沼硝化细菌的研究主要针对 AOB 进行^[6,9-10]。高互花米草沉积物 AOB 氨单加氧酶基因(*amoA*)丰度比矮互花米草沉积物的高 1—2 个数量级, 也比无植被沉积物的高^[9]。Wequetequock-Pawcatuck 盐沼高互花米草和狐米草 Spartina patens 沉积物 β-AOB amoA 丰度显著高于矮互花米草^[10]。Trias 等 2012 研究表明, Empordà 和 Doñana 湿地挺水性植物影响其根际 AOB 丰度^[6]。植被类型不同程度地影响湿地沉积物 AOB 群落结构和多样性^[11-13]。

双台河口滨海潮滩湿地位于辽宁省盘锦市辽东湾北部,已被列入国际重要湿地名录,拥有大面积的浅海 海域、翅碱蓬滩涂、芦苇田和水稻田,是我国高纬度地区最大的滨海河口湿地。目前对辽河口(主要范围位于 双台河口国家级自然保护区)芦苇湿地沉积物硝化作用、AOB 数量和群落研究表明,芦苇根际效应对硝化作 用有促进作用^[14]。AOB 多样性指数时空分布存在较大差异,盐分、总氮和有机质含量是 AOB 数量时空分布 的重要影响因素^[15]。不同盐度胁迫下 AOB 数量和群落结差异较大^[16]。但翅碱蓬 Suaeda heteroptera 对盐沼 微生物生物量及β-氨氧化细菌群落的影响尚未见报道。本试验以双台河口为例,研究翅碱蓬对盐沼沉积物 微生物生物量、16S rRNA 基因丰度、潜在硝化速率、β-AOB 丰度和群落结构的影响,为该生境的生态修复技术 提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

于 2013 年 7 月 4 日、8 月 14 日、9 月 26 日和 11 月 22 日,在双台河口潮滩湿地选取三个翅碱蓬生长良好, 密度均匀的采样站位,S1(40°55.821′N,121°46.764′E)、S2(40°55.409′N,121°46.886′E)和 S3(40°55.573′N, 121°46.796′E)(图 1),采集各站位 10—15 cm 沉积物样品,并在 S1 和 S2 附近选取无植被覆盖的裸滩区域,采 集同样深度的沉积物样品。采集的样品置于灭菌的自封袋内,低温保存带回实验室。



审图号: GS (2016) 147号

图 1 采样站位地理位置图 Fig.1 Location of sampling sites

1.2 样品测定

1.2.1 MBC 和微生物生物量氮(MBN)测定

沉积物 MBC 和 MBN 测定采用熏蒸提取法^[17],其中熏蒸处理为 25℃ 真空条件下培养 24 h,提取过程所用 浸提液为 0.5 mol/L K₂SO₄溶液(土液比 1:2.5)。浸提液中总有机碳的测定采用总有机碳测定仪(TOC V_{CPH}, 日本岛津)进行。MBC(mg/kg 湿土)和 MBN(mg/kg 湿土)分别由下式求得:

$\text{MBC} = E_{\text{C}}/k_{\text{EC}}$

$MBN = mE_{nin-N}$

式中, Ec 为熏蒸与未熏蒸沉积物总有机碳的差值, k_{EC}为转化系数, 取 0.45; E_{nin-N}为熏蒸与未熏蒸沉积物的茚 三酮反应态氮的差值, m 为转化系数, 取值 5.0

1.2.2 细菌 16S rRNA 基因丰度的定量

利用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)测定沉积物细菌 16S rRNA 基因丰度。使用试剂盒[基因组 DNA 快速抽提试剂盒(土壤),生工生物工程(上海)股份有限公司]提取沉积物总 DNA,由生工生物工程(上海)股份有限公司使用细菌 16S rRNA 基因通用引物对 F357/R518^[18]进行 PCR 扩增,将纯化后的 PCR 产物克隆到 大肠杆菌质粒中,用蓝白平板斑筛选出阳性克隆子,经过夜培养后提取出质粒 DNA,作为质粒标准品。质粒 标准品的原始浓度为 1.34×10⁹ copies/μL,对质粒标准品进行梯度稀释并扩增,20 μL 反应体系含 Green-2-Go qPCR masternix (2×) 10 μL,引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,模板 DNA 2 μL,ddH₂O 7 μL。扩增程序为 95℃酶 活化 10 min,95℃变性 15 s,60℃退火 60 s,40 个循环。扩增结束后根据各稀释度的已知起始拷贝数及相应 Ct 值作标准曲线。以沉积物 DNA 样品为模板进行 PCR 扩增,扩增条件与标准品相同,根据标准曲线计算样品 基因拷贝数。以每克湿土中所含有的 16S rRNA 基因拷贝数表示沉积物中细菌 16S rRNA 基因丰度。 **1.2.3** 潜在硝化速率测定

参考 Moin 等^[10]的加铵培养法稍加修改测定沉积物潜在硝化速率。称取约 10 g 沉积物样品,置于装有 100 mL NH₄Cl 培养液(25 mg N/L,盐度 5 PSU)的三角瓶中,用保鲜膜封口,并在上面扎几个孔,放置于恒温 振荡器上震荡 24 h (25℃ 150 r/min),每隔 4 h 取一次培养液 1 mL 离心(每次取液后用等量培养液补足), 用营养盐全自动分析仪(AutoAnalyzer 3)(德国 Bran Luebbe 公司)测定上清液中 NO₂⁻-N(萘乙二胺分光光度 法)、NO₃⁻-N 的含量(镉柱还原-萘乙二胺分光光度法)。依据指数期 NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 的增加计算潜在硝化 速率。

1.2.4 β-AOB 丰度定量

采用引物对为 amoA-1F/amoA-2R^[19] real-time PCR 对 β -AOB amoA 拷贝数进行测定,以每克湿土中所含 有的 amoA 拷贝数表示沉积物中 β -AOB 丰度,方法同 1.2.2。

1.2.5 β-AOB 群落结构分析

采用 DGGE 对沉积物 β-AOB 的群落结构进行分析,用β-AOB 的 16S rRNA 引物进行巢式 PCR 扩增,第一 次 PCR 扩增所用引物对为 βAMOf/βAMOr^[20]。50 μL 反应体系含 10×PCR buffer 5 μL,dNTP(2.5 mM) 4 μL, MgCl₂(25 mM) 3 μL,引物(10 mM)各 2 μL, *Taq* 酶(5 U/μL) 0.5 μL,DNA 模板 3 μL,ddH₂O 补足 50 μL。扩增程序为 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,30 个循环;72℃ 延伸 5 min。第二次 PCR 扩增上游引物为 CTO189f-A/B-GC 和 CTO189f-C-GC,下游引物为 CTO654r^[21]。50 μL 反应体系与第一 次 PCR 相同。扩增程序为 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,65℃ 退火 1 min(每个循环降低 0.5℃),72℃ 延伸 1 min,20 个循环;94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,10 个循环;72℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物上样含 45%—55%梯度变性剂的 6%聚丙烯酰胺凝胶,在 TAE 中电泳 16 h(温度 60℃,电压 70 V),然后用 Genefinder 核酸染料避光染色 30 min,凝胶成像仪观察。将优势条带切下,洗脱,用不带 GC 夹的相同引物进行 PCR 再扩增,产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将 DGGE 条带测序结果在 GeneBank 中进行 BLAST 比对,找出最相似序列,用系统发育分析软件包 MECA4.0 进行统计和聚类分析^[22]。采用邻接法

(neighbor-joining method)构建系统发育树,并通过自举分析(bootstrap)进行置信度检测,自举数据集为 1000 次。采用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱进行分析,得到每个条带的灰度值,计算β-AOB 群落的香农-维纳指 数(Shannon-Wiener)多样性指数(H'), H' = $\sum P_i \times \ln P_i = \sum (n_i/N) \times \ln(n_i/N)$, (P_i 代表第 i 条带的灰 度占样品总灰度的比率,n_i代表第 i 条带的灰度值,N 代表该泳道的条带总灰度值。

1.3 数据处理

用 SPSS16.0 软件对不同采样日期裸滩和翅碱蓬沉积物微生物生物量、16S rRNA 基因丰度、潜在硝化速 率和β-AOB 丰度数据进行单因素方差分析和 Tukey 多重比较,对同一采样日期两种生境数据进行独立样本 t 检验,当P < 0.05时存在显著差异。

2 结果

2.1 MBC 和 MBN

裸滩沉积物 MBC 随时间没有显著差异,但翅碱蓬沉积物 MBC 呈现一定的时间动态,8 月和9月较7月显 著升高(P < 0.05,图 2);所有采样月份翅碱蓬沉积物 MBC 显著高于裸滩(P < 0.05,图 2)。裸滩沉积物 MBN 8月最高,7月和11月较低(P<0.05,图3),翅碱蓬沉积物 MBN 8和9月显著高于7和11月(P<0.05,图 3)。当所有采样日期的数据结合分析时,翅碱蓬沉积物 MBN 显著高于裸滩(图 3, P < 0.05)。







裸滩(0)不同小写字母表示不同采样日期差异显著(P < 0.05),翅碱蓬(A0)不同大写字母表示不同采样 日期差异显著(P < 0.05),星号表示同一采样日期两种生境差异显著(P < 0.05)

2.2 细菌 16S rRNA 基因丰度

实时荧光定量 PCR 结果显示,裸滩沉积物 16S rRNA 基因丰度范围是 2.22×10°-4.07×10°拷贝/g(湿 重),翅碱蓬沉积物 16S rRNA 基因丰度范围是 2.82×10°- 5.57×10°拷贝/g (湿重)(图 4)。两种生境 16S rRNA 基因丰度随时间变化趋势基本一致,均是7月、8月和9月显著高于11月(图4,P<0.05)。当所有采 样日期的数据结合分析时,翅碱蓬植被显著影响沉积物细菌 16S rRNA 基因丰度(图 4, P < 0.05)。

2.3 潜在硝化速率

裸滩沉积物潜在硝化速率波动范围为0.42—0.59 mgN/kg/h;翅碱蓬沉积物潜在硝化速率波动范围为0. 59-0.99 mgN/kg/h(图5)。两种生境潜在硝化速率随时间没有显著差异。当所有采样日期的数据结合分析 时,翅碱蓬沉积物潜在硝化速率显著高于裸滩(图5,P<0.05)。

2.4 β-AOB 丰度

实时荧光定量 PCR 结果表明,裸滩沉积物 β-AOB amoA 丰度范围是 3.14×10⁵—4.78×10⁵拷贝/g(湿重),8

月显著高于9月和11月(图6,P<0.05);翅碱蓬地点的丰度范围是5.46×10⁵—7.45×10⁵拷贝/g(湿重),7 月和8月略高于9月和11月,但并无显著差异(图6)。当所有采样日期的数据结合分析时,翅碱蓬沉积物β-AOB amoA 丰度显著高于裸滩(图 6, P < 0.05)。



图 4 沉积物 16S rRNA 基因丰度



2.5 β-AOB 群落结构分析

沉积物的 DGGE 结果见图 7,裸滩沉积物 DGGE 条 带数目为 3-5条,翅碱蓬沉积物为 3-8条,两种生境 β-AOB 优势种群组成有一定差异,条带 7-4、8-3、9-2、9-6、9-7、11-5、11-6 和 11-7 是有植被沉积物 特异性条带。总计对 25 条 DGGE 优势条带序列 (Genbank 登录号: KT259283, KT259284, KT259285, KT259286, KT259287, KT259288, KT259289, KT259290, KT259291, KT259292, KT259293, KT259294, KT259295, KT259296, KT259297, KT259298, KT259299, KT259300, KT259301, KT259302, KT259303, KT259304, KT259305, KT280472, KT280473)进行 BLAST 分析,将不同月份获 得的相似性较高的序列合并构建系统发育树(图8)。



图 5 沉积物潜在硝化速率







结果表明,7月2条带(7-3和7-4)显示与亚硝化螺菌属 Nitrosospira 成员的较高的相似性(98-99%),8 月、9月和11月6条带(8-4、9-1、9-3、9-6、9-8和11-2)与未培养亚硝化单胞菌属 Nitrosomonas sp.克 隆相似性 97—99%。其中条带 9—6 与来源于葡萄牙 Douro 河河口沉积物尚未培养 Nitrosomonas sp. 克隆 MZS-2相似性 97%^[23]。两种生境细菌群落的香农维纳多样性指数见表 1,除了 8月份,翅碱蓬沉积物细菌 群落多样性较高。

Table 1 Shannon-Wiener diversity index of β -AOB community in salt marsh sediments			
采样日期	裸滩沉积物(0)	翅碱蓬沉积物(A0)	•
Sampling date	Bare mudflat sediment	Suaeda heteroptera sediment	
7月 July	0.83	0.99	
8月 August	1.60	1.09	
9月 September	1.43	1.84	
11 月 November	1.35	1.83	

沉积物 B-AOB 群落的香农维纳(Shannon-Wiener) 多样性指数

湿地土壤的微生物生物量碳氮受植被类型的影响, 如黄河故道湿地的碱蓬滩地和芦苇沼泽[24]及扎龙湿地 芦苇生境和草甸生境的 MBC 和 MBN^[25], 辽河三角洲不 同植被类型土壤(柽柳、草地、芦苇、玉米、森林、碱蓬、 翅碱蓬和翅芦苇)的 MBC 含量均不相同^[7]。本研究中 翅碱蓬生长区沉积物 MBC 和 MBN 显著高于裸滩,说明 植物对 MBC 和 MBN 有利。翅碱蓬湿地 MBC 时间变化 趋势与盘锦芦苇湿地 MBC 的基本一致^[26]。翅碱蓬沉 积物 MBC 和 MBN 7 月份较低,8 月和9 月显著升高,可 能与其生长有关,翅碱蓬 6-7月份生长最快,需要从土 壤中摄取大量营养物质,在一定程度上形成了与微生物 间的营养需求竞争,致使微生物可获得营养量降低,限 制了微生物的生长和繁殖,8月上旬生长缓慢,8月中下 旬开花,此时大量植物根系活动能力增强,使得土壤有 机质矿化作用增大,土壤养分充足,根系分泌物丰富,土 壤微生物生物量较高。

前人研究表明,实时荧光定量 PCR 可用于测定海 湾和沿海泻湖沉积物样品的细菌 16S rRNA 基因丰



图 7 巢式 PCR 扩增 CTO 片段的 DGGE 指纹图谱 Fig.7 DGGE profile of nested PCR-amplified CTO fragments 0-裸滩沉积物, A0-翅碱蓬沉积物

度^[27-28]。Empordà 和 Doňana 湿地挺水性植物(芦苇,川蔓藻 Ruppia maritima,流苏菜莨 Ruppia cirrhosa 和双穗 雀稗 Paspalum distichum)根际细菌 16S rRNA 基因丰度高于无植被沉积物^[6]。本研究中翅碱蓬沉积物中细菌 16S rRNA 基因丰度显著高于裸滩,九龙江河口湿地有类似结果,红树林沉积物的 16S 基因丰度显著高于裸 滩^[13],说明植物可促进细菌的生长。本试验裸滩沉积物细菌 16S rRNA 基因丰度范围与 Shinji 和 Nakaumi 湖 表层沉积物的细菌 16S rRNA 基因丰度范围一致^[28],但高于九龙江河口湿地裸滩(30 cm)沉积物^[13],低于胶 州湾表层(0—5 cm)沉积物和九龙江河口红树林自然保护区裸滩(0—5 cm 和 5—20 cm)沉积物^[27,29],其原因 之一可能是采样深度的不同,沉积物深度不同,总碳(TC)、总氮(TN)和 TC/TN 不同,细菌 16S rRNA 基因丰 度不同^[29]。

Dollhopf 等^[9]发现高互花米草沉积物的潜在硝化速率高于裸滩。本研究有类似的结果,翅碱蓬沉积物潜 在硝化速率高于裸滩。因为植物根系有助于沉积物充氧^[30],可能有助于促进硝化作用^[31]。Empordà 湿地 Basses d'en Coll 寡盐泻湖和 Doñana 国家公园 Lucio del Cangrejo 盐沼芦苇根际潜在硝化速率显著高于无植被 沉积物^[6]。本试验翅碱蓬沉积物的潜在硝化速率高于 Wequetequock-Pawcatuck 盐沼互花米草及狐米草沉积 物(0—2 cm)的潜在硝化速率^[10];裸滩沉积物的潜在硝化速率与珠江口表层沉积物的相同^[32]。

植被的类型影响湿地沉积物中β-AOB amoA 基因的丰度,Wequetequock-Pawcatuck 盐沼互花米草及狐米草沉积物(0—2 cm)的β-AOB amoA 丰度有明显差异^[10]。Trias 等^[6]研究表明,与无植被沉积物比较,Empordà和 Doñana 湿地挺水性植物(芦苇,川蔓藻,流苏菜莨和双穗雀稗)根际 AOB 丰度增加。Zhang 等^[29]研究表明,互花米草的入侵影响九龙江河口沉积物(0—5 cm) amoA 丰度。珠江河口红树林和芦苇表层湿地沉积物 AOB (最大或然数法)数量高于裸地沉积物^[32]。本研究翅碱蓬植被显著影响沉积物 β-AOB amoA 丰度,表明植物 有利于 AOB 的生存。本研究区β-AOB amoA 丰度范围与用实时荧光定量 PCR 测定的其它河口或盐沼表层 (0—5 cm)沉积物的β-AOB amoA 丰度范围—致^[8,10,33-37],高于莱州湾河口潮滩表层(0—5 cm)沉积物的β-AOB amoA 丰度范围—致^[8,10,33-37],高于莱州湾河口滤滩沉积物(0—15 cm)的β-AOB

7



图 8 沉积物 β-AOB DGGE 序列的系统发育树



amoA 丰度^[39-40]。

沉积物潜在硝化速率与 β -AOB amoA 丰度是否显著相关,不同学者研究结果并不一致。有的盐沼沉积物^[9]和河口沉积物^[35,41]潜在硝化速率与 β -AOB amoA 丰度呈显著正相关关系。Wequetequock-Pawcatuck 盐 沼不同植物生长区沉积物潜在硝化速率与 β -AOB amoA 丰度相关关系不同,只有高互花米草沉积物两者显著 相关,矮互花米草和狐米草沉积物两者之间不相关^[10]。其他河口沉积物^[34,42]潜在硝化速率与 β -AOB amoA 丰度之间没有相关性。本研究中翅碱蓬沉积物和裸滩沉积物两者之间也没有显著相关关系(翅碱蓬沉积物 r= 0.148,P = 0.647;裸滩 r = -0.085,P = 0.841)。实际上考虑到潜在硝化速率不代表原位速率和因此不能 够准确反映出硝化种群存在是很重要的。也许是潜在速率试验期间的条件(如氧气、铵或盐度)不是对所有 硝化细菌都是最适的。在未来的研究中,除了丰度之外,测量基因表达可能有助于更好地量化起作用的 种群^[10]。

关于植被对湿地沉积物 β-AOB 群落的影响,不同学者针对不同植被得出的结论并不一致。互花米草入 侵对九龙江河口沉积物(0—5 cm 和 5—20 cm)β-AOB 群落组成没有影响^[29]。在 Scheldt 河口潮汐淡水沼泽 植物对沉积物(0,5,10,20 cm)β-AOB 类群影响较小^[11]。Li 等^[12]研究表明,红树林树木强烈影响米埔自然保 护区湿地沉积物(1—2 cm,20—21 cm)β-AOB 群落多样性。九龙江河口湿地裸滩沉积物(30 cm)β-AOB 多样 性高于红树林沉积物^[13]。从九龙江河口裸滩沉积物获得序列属于 *Nitrosospira*,而红树林沉积物超过 75%的 所有细菌 *amoA* 序列和所有优势 *amoA* 序列属于 *Nitrosomonas*^[13]。美国康涅狄格州东南部 Wequetequock – Pawcatuck 潮汐沼泽(0—2 cm)不同植被类型(互花米草及狐米草沉积物)沉积物的β-AOB *amoA* 克隆文库获 得的序列属于 *Nitrosospira*^[10]。本实验从裸滩和翅碱蓬沉积物获得的序列属于 *Nitrosospira* 和 *Nitrosomonas*,翅 碱蓬植被对 β-AOB 群落组成和多样性均有一定的影响。

4 结论

不同采样日期裸滩沉积物 MBC、翅碱蓬地点的 β-AOB amoA 丰度和两种生境潜在硝化速率没有显著差异;翅碱蓬沉积物 MBC、裸滩沉积物的 β-AOB amoA 丰度和两种生境 MBN 及细菌 16S rRNA 基因丰度呈现时间变化。结合所有采样日期的数据分析表明,翅碱蓬植被显著影响沉积物 MBC、MBN、细菌 16S rRNA 基因丰度、潜在硝化速率和β-AOB amoA 丰度;植物对β-AOB 群落组成和多样性均有一定的影响。

参考文献(References):

- Schubauer J P, Hopkinson C S. Above- and belowground emergent macrophyte production and turnover in a coastal marsh ecosystem, Georgia. Limnology and Oceanography, 1984, 29(5): 1052-1065.
- [2] Mendonça A, Duarte A C, Santos E B H. Spectroscopic properties of sedimentary humic acids from a salt marsh (Ria de Aveiro, Portugal): comparison of sediments colonized by *Halimione portulacoides* (L.) Aellen and non-vegetated sediments. Biogeochemistry, 2004, 69(2): 159-174.
- [3] Singh B K, Millard P, Whiteley A S, Murrell J C. Unravelling rhizosphere-microbial interactions: opportunities and limitations. Trends in Microbiology, 2004, 12(8): 386-393.
- [4] Burke D J, Hamerlynck E P, Hahn D. Interactions among plant species and microorganisms in salt marsh sediments. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(3): 1157-1164.
- [5] Oliveira V, Santos A L, Aguiar C, Santos L, Salvador C, Gomes N C M, Silva H, Rocha S M, Almeida A, Cunha Â. Prokaryotes in salt marsh sediments of Ria de Aveiro: Effects of halophyte vegetation on abundance and diversity. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2012, 110: 61-68.
- [6] Trias B, Ruiz-Rueda O, García-Lledó A, Vilar-Sanz A, López-Flores R, Quintana X D, Hallin S, Bañeras L. Emergent macrophytes act selectively on ammonia-oxidizing bacteria and archaea. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(17): 6352-6356.
- [7] 赵先丽,周广胜,吕国红.辽河三角洲不同植被类型土壤微生物特征研究.土壤通报,2009,40(6):1266-1269.
- [8] Santoro A E, Francis C A, De Sieyes N R, Boehm A B. Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. Environmental Microbiology, 2008, 10(4): 1068-1079.
- [9] Dollhopf S L, Hyun J H, Smith A C, Adams H J, O'Brien S, Kostka J E. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria and factors controlling nitrification in salt marsh sediments. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(1): 240-246.
- [10] Moin N S, Nelson K A, Bush A, Bernhard A E. Distribution and diversity of archaeal and bacterial ammonia oxidizers in salt marsh sediments. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7461-7468.
- [11] Laanbroek H J, Speksnijder A G C L. Niche separation of ammonia-oxidizing bacteria across a tidal freshwater marsh. Environmental Microbiology, 2008, 10(11): 3017-3025.
- [12] Li M, Cao H L, Hong Y G, Gu J D. Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(4): 1243-1254.
- [13] Luo Z X, Qiu Z Z, Wei Q S, Du Laing G, Zhao Y L, Yan C Z. Dynamics of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in relation to nitrification along simulated dissolved oxygen gradient in sediment-water interface of the Jiulong river estuarine wetland, China. Environmental Earth Sciences, 2014, 72(7): 2225-2237.
- [14] 白洁,陈春涛,赵阳国,田伟君,董晓,尹宁宁.辽河口湿地沉积物硝化细菌及硝化作用研究.环境科学,2010,31(12):3011-3017.
- [15] 白洁, 董晓, 赵阳国. 辽河口芦苇湿地土壤氨氧化菌的时空变化. 中国环境科学, 2011, 31(11): 1870-1874.
- [16] 钟丽华,董晓,白洁,王妍,赵阳国.辽河口芦苇湿地氨氧化菌群落结构与土壤盐分的关系.中国海洋大学学报,2013,43(4):94-99.
- [17] 吴金水,林启美,黄巧云,肖和艾.土壤微生物生物量测定方法及其应用.北京:气象出版社,2006:54-74.
- [18] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of

polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.

- [19] 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. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(12): 4704-4712.
- [20] McCaig A E, Embley T M, Prosser J I. Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidisers. FEMS Microbiology Letters, 1994, 120(3): 363-367.
- [21] Kowalchuk G A, Stephen J R, De Boer W, Prosser J I, Embley T M, Woldendorp J W. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(4): 1489-1497.
- [22] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4. 0. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [23] Magalhães C, Bano N, Wiebe W J, Hollibaugh J T, Bordalo A A. Composition and activity of beta-Proteobacteria ammonia-oxidizing communities associated with intertidal rocky biofilms and sediments of the Douro River estuary, Portugal. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(4): 1239-1250.
- [24] 朱新玉. 黄河故道湿地土壤质量因子与景观类型的耦合关系. 资源科学, 2015, 37(1): 85-93.
- [25] 张静,马玲,丁新华,陈旭日,马伟.扎龙湿地不同生境土壤微生物生物量碳氮的季节变化.生态学报,2014,34(13):3712-3719.
- [26] 赵先丽,周广胜,周莉,吕国红,贾庆宇,谢艳兵.盘锦芦苇湿地土壤微生物生物量C的季节动态.土壤通报,2008,39(1):43-46.
- [27] Dang H Y, Li J, Chen R P, Wang L, Guo L Z, Zhang Z N, Klotz M G. Diversity, abundance, and spatial distribution of sediment ammoniaoxidizing betaproteobacteria in response to environmental gradients and coastal eutrophication in Jiaozhou Bay, China. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(14): 4691-4702.
- [28] Tsuboi S, Amemiya T, Seto K, Itoh K, Rajendran N. The ecological roles of bacterial populations in the surface sediments of coastal lagoon environments in Japan as revealed by quantification and qualification of 16S rDNA. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29 (5): 759-774.
- [29] Zhang Q F, Peng J J, Chen Q, Li X F, Xu C Y, Yin H B, Yu S. Impacts of Spartina alterniflora invasion on abundance and composition of ammonia oxidizers in estuarine sediment. Journal of Soils and Sediments, 2011, 11(6): 1020-1031.
- [30] Mendelssohn I A, McKee K L, Patrick W H Jr. Oxygen deficiency in *Spartina alterniflora* roots: metabolic adaptation to anoxia. Science, 1981, 214(4519): 439-441.
- [31] An S, Joye S B. Enhancement of coupled nitrification-denitrification by benthic photosynthesis in shallow estuarine sediments. Limnology and Oceanography, 2001, 46(1): 62-74.
- [32] 王玉萍,王立立,李取生,叶妹.珠江河口湿地沉积物硝化作用强度及影响因素研究.生态科学,2012,31(3):330-334.
- [33] Mosier A C, Francis C A. Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary. Environmental Microbiology, 2008, 10(11): 3002-3016.
- [34] Zheng Y L, Hou L J, Newell S, Liu M, Zhou J L, Zhao H, You L L, Cheng X L. Community dynamics and activity of ammonia-oxidizing prokaryotes in intertidal sediments of the Yangtze estuary. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(1): 408-419.
- [35] Bernhard A E, Tucker J, Giblin A E, Stahl D A. Functionally distinct communities of ammonia-oxidizing bacteria along an estuarine salinity gradient. Environmental Microbiology, 2007, 9(6): 1439-1447.
- [36] Cao H L, Hong Y G, Li M, Gu J D. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing prokaryotes in sediments from the coastal Pearl River estuary to the South China Sea. Antonie van Leeuwenhoek, 2011, 100(4): 545-556.
- [37] Jin T, Zhang T, Ye L, Lee O O, Wong Y H, Qian P Y. Diversity and quantity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in sediment of the Pearl River Estuary, China. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(3): 1137-1145.
- [38] Zhang X L, Agogué H, Dupuy C, Gong J. Relative abundance of ammonia oxidizers, denitrifiers, and anammox bacteria in sediments of hypernutrified estuarine tidal flats and in relation to environmental conditions. Clean-Soil, Air, Water, 2014, 42(6): 815-823.
- [39] Cao H L, Li M, Hong Y G, Gu J D. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in polluted mangrove sediment. Systematic and Applied Microbiology, 2011, 34(7): 513-523.
- [40] Wang Y F, Feng Y Y, Ma X J, Gu J D. Seasonal dynamics of ammonia/ammonium-oxidizing prokaryotes in oxic and anoxic wetland sediments of subtropical coastal mangrove. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(17): 7919-7934.
- [41] Bernhard A E, Landry Z C, Blevins A, de la Torre J R, Giblin A E, Stahl D A. Abundance of ammonia-oxidizing *archaea* and *bacteria* along an estuarine salinity gradient in relation to potential nitrification rates. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(4): 1285-1289.
- [42] Caffrey J M, Bano N, Kalanetra K, Hollibaugh J T. Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. The ISME Journal, 2007, 1(7): 660-662.