

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(1):83–90; 4 January 2011
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

长江三峡大坝两侧水体中氨氧化微生物种群结构分析

黄柳琴¹, 蒋宏忱^{1*}, 王尚¹, 张传伦^{2,3}, 董海良^{1,4*}

¹中国地质大学,地质过程与矿产资源国家重点实验室,地质微生物实验室,北京 100083

²同济大学,海洋地质国家重点实验室,上海 200092

³Department of Marine Sciences, University of Georgia, Athens, GA 30602

⁴中国地质大学,生物地质与环境地质教育部重点实验室,武汉 430074

摘要:【目的】研究自然界中的氨氧化微生物对于理解全球氮元素循环至关重要,而人们对于人工坝体对氨氧化微生物种群生态的影响还知之甚少。本工作旨在分析三峡大坝两侧水体中浮游和附着在颗粒表面的氨氧化微生物种群构成的多样性,并试图分析其潜在的控制因素。【方法】在靠近三峡坝体的上游水体及下游水体中各选取1个取样点,在取样点现场测量水体理化参数并收集生物量,采用氨氧化功能基因的 mRNA 逆转录产物构建克隆文库等技术分析样品中氨氧化微生物种群的多样性。【结果】坝下水体中浊度、溶氧量和氧化还原电位略高于坝上水体。坝体两侧的氨氧化菌以氨氧化古菌(AOA)为主,没有检测到氨氧化细菌(AOB)。坝体两侧水体不同存在方式的 AOA 组群存在差异:坝上水体中附着在颗粒表面的 AOA 多样性较高,而坝下水体中浮游的 AOA 多样性更高;坝上水体中附着在颗粒表面与浮游的 AOA 种群间的差异明显大于坝下水体。【结论】三峡大坝对坝体两侧水体中 AOA 种群主体构成的影响不是很明显,但三峡大坝产生的水动力条件改变影响了坝体两侧水体中浮游和附着在颗粒表面的 AOA 组群分布。

关键词: 三峡大坝,氨氧化,氨氧化古菌,种群

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2011)01-0083-08

作为世界上最大的水利工程,自建成以来,长江三峡大坝已经产生了巨大的经济效益(如防洪、发电等)。然而,自提出方案至建成投入使用,三峡大坝对生态的影响一直备受关注^[1]。三峡大坝对植物与动物生态的影响较为明显(文献1–4及其引用的文献),而其对微生物生态的影响,却知之甚少。关于三峡大坝对微生物生态方面影响的研究中,前人多着眼于长江水体中的细菌种群结构分

析^[5,6],或者是三峡大坝对微生物种群影响的远程效应^[6–8]。而有关它对长江水体中功能微生物(例如:氨氧化微生物)种群的影响,至今罕有报道。好氧氨氧化微生物包括氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA),是一类特别重要的功能微生物种群。它们是自然界氮元素循环必不可少的微生物种群之一。自然界中的氮元素循环包括氮固定($N_2 \rightarrow NH_3$)、硝化($NH_3 \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$)和反硝化,每个步

基金项目:中国地质大学(北京)地质过程与矿产资源国家重点实验室特别资助项目(GPMR2008K08B和GPMR200844);中国地质大学(武汉)教育部长江三峡库区地质灾害研究中心研究基金(TGRC201023);中国教育部111工程(B07011);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目

* 通信作者。Tel: +86-10-82334651; Fax: +86-10-82322175; E-mail: hongchen.jiang@gmail.com, dongh@cugb.edu.cn

作者简介:黄柳琴(1987–),女,江西乐平人,本科生,主要从事地质微生物学及地球化学研究。E-mail: huanglq1987@163.com

收稿日期:2010-06-06; **修回日期:**2010-09-08

骤都有微生物的参与。其中, AOB 和 AOA 是转化 NH_3 为 NO_2^- 的关键功能种群^[9]。因此, 研究各种环境中 AOB 和 AOA 的生态分布特征对于理解自然界中的氮元素生物地球化学循环至关重要。那么三峡大坝会对坝体附近水体中的 AOB 和 AOA 种群有哪些影响呢?

氨单加氧酶是转化 NH_3 为 NO_2^- 的关键酶。AOB 和 AOA 都具有氨单加氧酶基因 (*amoA*)。因此, *amoA* 基因被广泛使用于研究环境中 AOB 和 AOA 的丰度和种群多样性^[10]。本研究通过分析水体中的 *amoA* 基因多样性, 揭示三峡大坝两侧水体中 AOB 和 AOA 种群构成及空间分布差异, 并对其与环境参数的相关性作初步探讨。

1 材料和方法

1.1 样品收集与实验材料

1.1.1 样品收集与保存: 在邻近长江三峡大坝坝体两侧水体中, 各选取 1 个点位, 用 GPS 定位仪确定每个采样点的经纬度 (表 1)。在每个点位, 用多功能水质测试仪 (Horiba, 日本) 现场测量水体的理化性质, 所测的理化参数包括: 深度 (DEP)、温度 (TEMP)、浊度 (TURB)、氧化还原电位 (ORP)、导电率 (COND)、盐度 (SAL)、总溶解固体量 (TDS)、海水视比重 (σ_t)、溶氧量 (DO) 以及氨含量。由于坝体两侧水深的差别, 在坝体两侧测量的水体深度间隔分别为 5 米和 1 米。在每个测量深度, 参照文献 [11] 的水样预处理方法, 用潜水泵抽取水样。将水样按顺序通过 0.7 μm 和 0.22 μm 的微孔滤膜 (分别收集附着在颗粒表面和浮游的微生物量), 然后将所得带有微生物量的滤膜装入无菌管并立即放入液氮罐保存。为了收集用于测量溶解有机碳量 (DOC) 的水样, 将通过 0.22 μm 微孔滤膜的水样灌装入无菌的 50 mL 离心管。然后, 盖紧并保存在 4℃。待返回实验室后, 将微生物和 DOC 样品分别保存于 -80℃ 和 4℃ 冰箱, 直至进一步分析。

1.1.2 主要试剂和仪器: FastRNA[®] Pro Soil-Direct 试剂盒 (美国 MP BIO)、High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits (美国 Applied Biosystem)、Agarose Gel DNA purification Kit Ver. 2.0 (日本 TaKaRa)、pGEM-T Easy Vector Systems (日本 TaKaRa)、Horiba W23 (日本)、Bio-Rad ALD1244 PCR 仪 (美国 Bio-Rad)、以及 Eppendorf 5417R 高速台式离心机 (德国

Eppendorf) 等。

1.2 水化学测试

在同济大学海洋学院测量水体样品的溶解有机碳 (DOC) 浓度。

1.3 扩增 *amoA* 基因

1.3.1 RNA 提取及 cDNA 合成: 参照文献 [12-14], 用 FastRNA[®] Pro Soil-Direct 试剂盒提取样品中的总 RNA (参照该试剂盒生产商建议的步骤); 用 RNase-free DNase I (Takara, Japan) 消化 RNA 样品中可能存在的基因组 DNA 污染^[12-14]; 最后, 用我们已经建立的方法^[12-14], 检查经 DNA 酶消化后的 RNA 样品是否纯净; 用验证后的纯净 RNA 作为模板, 用 High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits 逆转录试剂盒合成 cDNA^[13,14] (参照该试剂盒生产商建议的步骤)。

1.3.2 PCR 扩增 *amoA* 基因及 PCR 扩增产物纯化回收: 用合成的 cDNA 作为模板, 采用通用的 *amoA* 基因扩增引物, 即 AmoA-1F (5'-GGGTTTCTACTGCTGCT-3')/AmoA-2R (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3') 引物对^[15] 和 Arch-amoAF (5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3')/Arch-amoAR (5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3') 引物对^[16], 参照文献 [8] 中的 PCR 反应条件, 分别对样品中 AOB 和 AOA 的 *amoA* 基因进行扩增, 然后用凝胶 (1.0%) 电泳检测 PCR 扩增产物。用 TaKaRa Agarose Gel DNA purification Kit Ver. 2.0 试剂盒纯化回收 AOA 的 *amoA* 基因 PCR 扩增产物 (参照该试剂盒生产商建议的步骤)。

1.4 克隆文库构建和系统进化分析

参照文献 [12,13], 共建立 4 个 AOA *amoA* 基因的克隆文库 (TG_BD0.2_AOA、TG_BD0.7_AOA、TG_FD0.2_AOA 和 TG_FD0.7_AOA 分别对应于坝上水体和坝下水体中浮游和附着在颗粒表面的 AOA 种群)。在每个文库中, 随机选择大约 30 个克隆, 并分析其 *amoA* 基因序列。测序工作在上海生工北京测序部完成。用 Sequencher v. 4.8 软件编辑原始 *amoA* 基因克隆序列, 获得可信长度约 635 bp 的基因序列; 然后利用 DOTUR 软件^[17] 分析克隆序列, 具有 2% 的序列差别者^[16], 定义为分类操作单元 (即 Operational taxonomic unit, 简称为 OTU)。在选取 OTU 的同时, 对每个文库进行饱和曲线分析。每个 OTU 中选取 1 个克隆序列 (如果该 OTU 含有的克隆序列多于 1 个) 做为代表序列, 将其与 NCBI

网络数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中的同源序列进行比对。根据比对结果,选取相似度最高的同源序列作为参照序列。将选取的同源参照序列和本研究所得 OTU 代表序列结合在一起。然后,通过 Bioedit 软件包中的 ClustalW,将序列对齐,并将对齐后的序列文件转为 MEGA 4.0 软件的文件输入格式。最后,用 MEGA 4.0 软件做系统进化分析。构建系统进化树时,迭代运算 1000 次。

1.5 数据分析

用公式 $C = 1 - n/N$ (其中 C 为覆盖率,即 coverage, n 为文库中只出现 1 次的克隆数量, N 为该文库克隆总数) 计算文库的覆盖率^[12]。用 DOTUR 软件分析制作了克隆文库的饱和曲线(曲线越趋于平缓,覆盖率越大,表明所得克隆越能真实反映环境中的多样性);并分析计算了各文库 AOA

amoA 基因多样性参数(Chao1、Simpson 和 Shannon;一般可认为数值越大,多样性越高)。参照文献[12],用 LIBSHUFF 软件分析得克隆文库之间差异性。

1.6 DNA 序列在基因库中的登录号

此研究所测定的克隆序列均已经递交至 GenBank 中,登录号为:HM443610-HM443631。

2 结果和讨论

2.1 水体理化性质

坝上水体和坝下水体的 pH、电导率、温度、盐度、总固体溶解量、海水视比重以及氨含量基本相同,只是坝下水体的浊度、氧化还原电位、溶氧量、以及溶解有机碳含量略高于坝上水体,详见表 1。

表 1 三峡大坝两侧采样点水体理化参数^a

Table 1 Physico-chemical characteristics of river waters collected behind and in front of the Three Gorges Dam of the Yangtze River

Sampling location(E/N)	DEP ^b /m	TURB ^b / (NTU)	ORP ^b /mV	DO ^b	DOC ^b
				/(mg/L)	
TG_BD ^b (111°00'22"E/30°49'53"N)	5.1	190	155	7.6	3.371
	10.1	320	157	7.4	ND
	15.1	390	155	7.5	2.976
	20.2	430	160	7.5	ND
	25.3	410	163	7.4	3.482
TG_FD ^b (111°03'19"E/30°50'07"N)	2.1	480	180	8.1	ND
	3.5	460	180	8.0	ND
	4.6	440	180	8.0	ND
	4.8	420	181	8.0	4.082

^a The conductivity, salinity, total dissolved solid (TDS), specific gravity of seawater (σ_t), and ammonia concentration were 23 ms/m, 0‰, 0.15 g/L, 0, and 0.100 μ g/L, respectively.

^b The samples behind and in front of the Three Gorges Dam were labeled with TG_BD and TG_FD, respectively; DEP: depth; TURB: turbidity; ORP: oxidation-reduction potential; DO: dissolved oxygen; DOC: dissolved organic carbon; NTU: Nephelometric Turbidity Units (the unit for turbidity); and ND: not determined.

2.2 三峡大坝两侧水体中 AOB 和 AOA 种群结构

本研究中没有扩增到 AOB *amoA* 基因,我们推测其原因可能为:三峡大坝库区附近的水体中 AOB 丰度远远低于 AOA,三峡大坝两侧水体的氨氧化微生物优势种群为 AOA。这一现象与其它淡水环境(如:海洋和土壤)中 AOA 和 AOB 相对丰度(文献[12]及其引用文献)相似,即 AOA 占主体。因此,三峡大坝的存在并没有影响 AOA 和 AOB 在三峡库

区水体中的相对分布特征。

2.3 三峡大坝两侧水体中的 AOA 种群构成及多样性

从 4 个 AOA 的 *amoA* 基因克隆文库中,共获得 110 个有效克隆序列。其中,TG_BD0.2_AOA、TG_BD0.7_AOA、TG_FD0.2_AOA 和 TG_FD0.7_AOA 中分别具有 27、29、24 和 30 个 *amoA* 序列。克隆文库覆盖率计算显示所检测的克隆数代表了 83.3%

-100.0%的克隆文库覆盖率(表2),饱和曲线计算也显示出各文库用于测序的克隆数量达到或接近饱和(未显示数据),表明本研究所得的 AOA 种群信息较好地代表了真实环境中的 AOA 多样性。

基于 2% 的序列差异, TG_BD0.2_AOA、TG_BD0.7_AOA、TG_FD0.2_AOA 和 TG_FD0.7_AOA 4 个文库中分别含有 3、8、7 和 4 个 OTUs(表 2)。系统发育分析将这些 OTUs 分成 2 个组群: Soil/sediment 和 Sediment(图 1;表 2)。其中,属于 Soil/sediment 这一组群的克隆序列在各文库中占绝大多数:克隆总数为 107 个,占总克隆数的 97.3%,属于 19 个 OTUs,占总 OTUs 的 86.4%(表 2)。同时,属

于 Soil/sediment 这一组群的克隆序列和 *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 聚为一群(图 1)。SCM1 源自水族馆的底泥层,是迄今为止唯一被分离培养的低温氨氧化古菌菌株^[18]。属于 Sediment 组群的克隆序列和 OTU 数很少,均为 3 个(每个 OTU 只有 1 个克隆序列),分别占总克隆数和总 OTU 数的 2.7% 和 13.6%(图 1;表 2)。同时,OTU 数量和克隆文库多样性指数(Chao1、Simpson 和 Shannon)计算结果显示,坝下水体中浮游的 AOA 种群多样性高于坝上水体中浮游的 AOA 种群;坝下水体中附着在颗粒表面的 AOA 种群多样性低于浮游的 AOA 种群,与坝上水体正好相反(表 2)。

表 2 三峡大坝两侧基因文库的多样性指数及主要类群的同源关系分析

Table 2 Diversity indices and major group affiliation of clone libraries retrieved from behind and in front of the Three Gorges Dam of the Yangtze River

Clone library		TG_BD0.2_AOA		TG_BD0.7_AOA		TG_FD0.2_AOA		TG_FD0.7_AOA	
Cutoff		2%	5%	2%	5%	2%	5%	2%	5%
No. of sequenced clones		27		29		24		30	
OTUs		3	1	8	4	7	2	4	2
Coverage (%)		100	100	86.2	89.7	83.3	95.8	96.7	96.7
Chao1		3	1	9.5	7	10	2	4	2
Simpson Index (1/D)		0.32	1	0.41	0.79	0.39	0.92	0.60	0.93
Shannon Index (H')		1.09	0	1.33	0.46	1.29	0.17	0.77	0.15
Major group affiliation		Number of clones (Relative abundance in each clone library) and 2% cutoff-based OTUs (Relative abundance in each clone library)							
Soil/sediment	No. of clones	27 (100%)		28 (96.6%)		23 (95.8%)		29 (96.7%)	
	OTUs	3 (100%)		7 (87.5%)		6 (85.7%)		3 (75%)	
Sediment	No. of clones	0 (0%)		1 (3.4%)		1 (4.2%)		1 (3.3%)	
	OTUs	0 (0%)		1 (12.5%)		1 (14.3%)		1 (25%)	

^a The conductivity, salinity, total dissolved solid (TDS), specific gravity of seawater (σ_t), and ammonia concentration were 23 ms/m, 0‰, 0.15 g/L, 0, and 0.100 $\mu\text{g/L}$, respectively.

^b The samples behind and in front of the Three Gorges Dam were labeled with TG_BD and TG_FD, respectively; DEP: depth; TURB: turbidity; ORP: oxidation-reduction potential; DO: dissolved oxygen; DOC: dissolved organic carbon; NTU: Nephelometric Turbidity Units (the unit for turbidity); and ND: not determined.

2.4 三峡大坝两侧水体中不同生存方式的 AOA 组群差异及其原因分析

尽管三峡大坝两侧水体中的 AOA 种群主体构成大体一致,但水动力条件改变了浮游和附着在颗粒表面的 AOA 组群分布。具体表现在以下两个方面:

(1)从 AOA 主要组群的同源关系来看,坝上水

体中附着在颗粒表面的 AOA 种群多样性高于其浮游的 AOA,而坝下水体中的情况则刚好相反;坝上水体中浮游的 AOA 种群与坝下水体中附着在颗粒表面的 AOA 组群多样性相似;同理,坝上水体中附着在颗粒表面的 AOA 组群与坝下水体中浮游的 AOA 组群多样性也大体一致(表 2)。他人研究表明,水动力条件可能是影响浮游和附着细菌组群分

布的一个关键原因^[19]。同时,也有实验证明,水体的搅动可以影响 *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 的生长^[20]。因此,我们推论,三峡大坝引起的水动力条件的改变促进了浮游和附着在颗粒表面的 AOA 种群之间的交换。这一推论可以从坝上与坝下水体中

AOA 主要种群从属关系中得到佐证。例如,在坝上水体中,属于 Sediment 组群的克隆仅存在于附着在颗粒表面的 AOA 组群,而在浮游的 AOA 种组群中没有;坝下水体中,属于这类组群的克隆同时存在于浮游和附着在颗粒表面的 AOA 种群(表 2)。

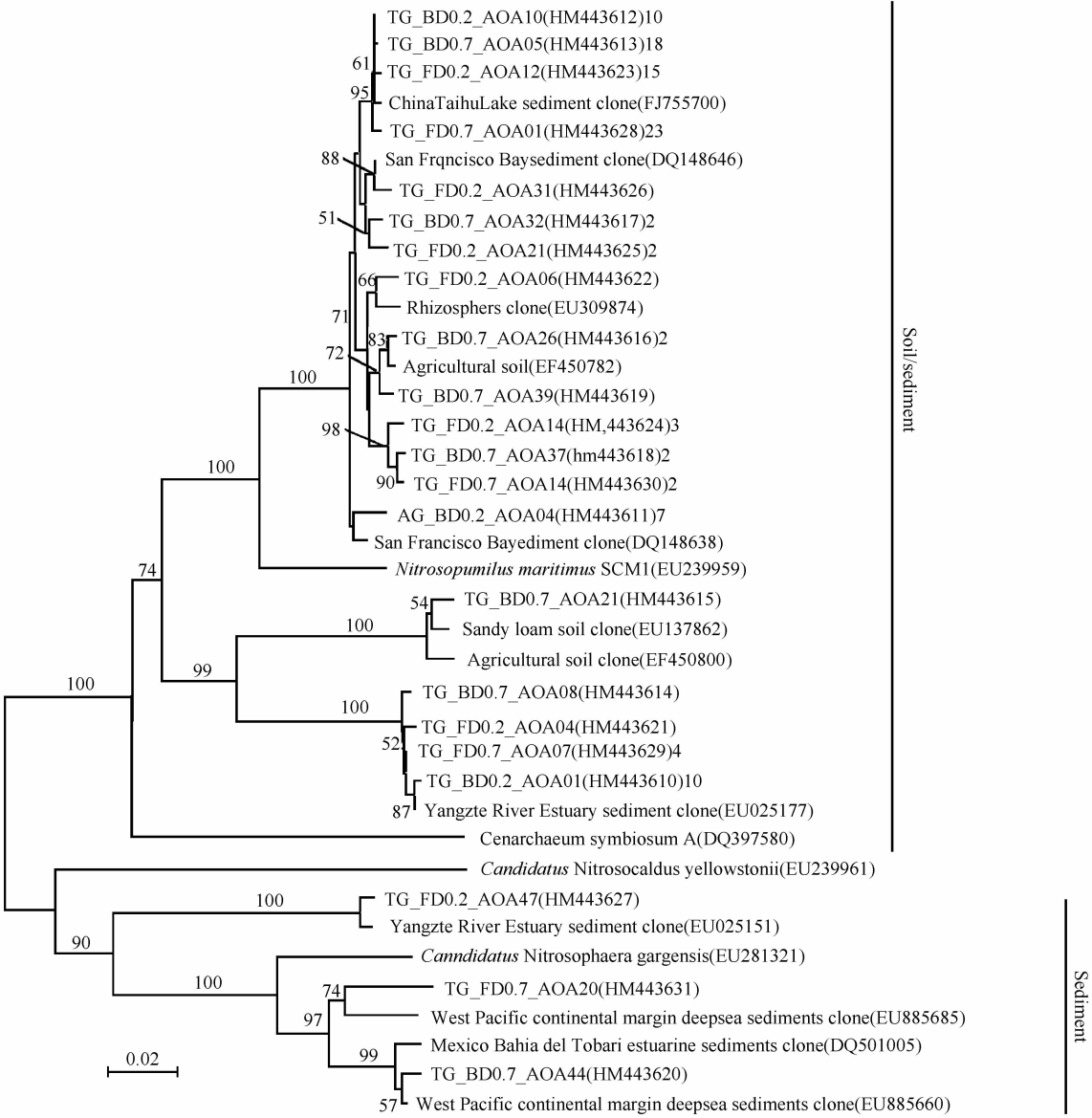


图 1 基于 *amoA* 基因构建的长江三峡大坝两侧水体中的氨氧化古菌系统发育树,序列的 GenBank 登录号列于括号中,树中分支点上的数字为迭代运算 1000 次的靴值 (小于 50% 的值未标出),标尺长度为 2% 的核苷酸置换率

Fig. 1 Neighbor-joining tree (partial sequences, ~ 635 bp) showing the phylogenetic relationships of archaeal *amoA* gene sequences cloned retrieved from the studied water samples to closely related sequences obtained from the GenBank database. One representative clone type per OTU is shown, and the number of clones of each OTU is shown at the end (after the GenBank accession number). If there is only one clone sequence within a given OTU, the number "1" is omitted. Clones are named as follows for the example of TG_FD0.7_AOA20: AOA *amoA* clone number 20 from the 0.7- μ m fraction of the water sample in front of the Three Gorges Dam. "TG_BD" means "behind the Three Gorges Dam", and "0.2" means "the 0.22- μ m fraction of the water sample". Bootstrap values of > 50% (for 1000 iterations) are shown. The scale bar indicates the Jukes-Cantor distances. Bar, 2% sequence divergence.

(2) 管坝体引起的水动力条件改变可以促进坝下水体中浮游和附着在颗粒表面的 AOA 种群之间的交换,但是,位于同样生态位(浮游或附着在颗粒表面)的 AOA 种群构成更趋于一致。例如,LIBSHUFF 分析结果显示,坝上(TG_BD0.2_AOA)与坝下(TG_FD0.2_AOA)水体中浮游的 AOA 种群结成一组,而坝上(TG_BD0.7_AOA)与坝下(TG_FD0.7_AOA)水体中附着在颗粒表面的 AOA 种群聚为另一群,这两组之间的差异远远大于各组内两样品之间的差异(图 2)。

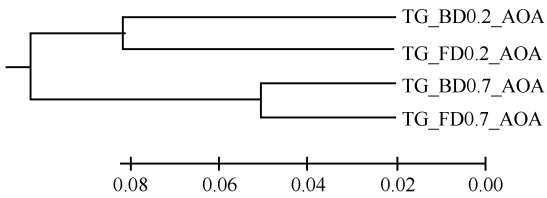


图 2 基于 LIBSHUFF 分析的氨氧化古菌 *amoA* 基因文库聚类分析图

Fig. 2 Clustering of the different AOA *amoA* gene clone libraries based on ΔC_{xy} values from the LIBSHUFF analysis. The tree was constructed with the unweighted-pair group method using average linkages in MEGA4.1. The parameter ΔC_{xy} in the LIBSHUFF analysis represents the difference in coverage of any two clone libraries (the larger ΔC_{xy} , the greater dissimilarity between the given clone libraries). The software for the analysis was available at <http://whitman.myweb.uga.edu/libshuff.html>

此外,除了水动力条件改变,水体中的颗粒组成和溶氧变化也可影响不同生存方式的 AOA 组群分布。例如,强大的冲刷力可以从坝下河床卷起更多的沉积物颗粒,使水体中的悬浮颗粒组成不同于坝上水体(坝下水体的浊度明显高于坝上水体)。前人研究显示,颗粒的性质可以影响浮游和附着在颗粒表面的细菌组群分布^[19]。另外,溶氧也可以影响氨氧化作用。通常 AOA 一般更适应于低氧或微氧环境^[21]。三峡大坝坝上水体的溶氧量(7.5 mg/L)和氧化还原电位(155 mV)略低于坝下(8.0 mg/L 和 181 mV,与强烈的水搅动有关),但两者都属于相对富氧环境,溶氧对 AOA 影响尚待进一步研究。然而,水体中的颗粒组成和溶氧(氧化还原电位)变化是和水动力条件直接相关的。所以,水动力条件应是改变不同生存方式的 AOA 组群分布的直接因素。

3 结论

根据我们的研究得出以下结论:

- (1) 三峡大坝两侧江水中氨氧化微生物以氨氧化古菌(AOA)为主,AOB 丰度明显低于 AOA;
- (2) 两侧水体不同存在方式的 AOA 种群存在差异:坝上水体中附着在颗粒表面的 AOA 多样性高于浮游的 AOA,而坝下水体中浮游的 AOA 多样性高于附着在颗粒表面的 AOA;坝上水体中附着在颗粒表面与浮游的 AOA 种群间的差异明显大于坝下水体;同一生存方式(浮游或附着在颗粒表面)的 AOA 种群在坝上和坝下水体之间的差异远远小于坝上或坝下水体中不同生存方式 AOA 组群之间的差异。大坝引起的水动力条件变化可能是引起这种 AOA 组群分布变化的关键原因,但具体原因仍有待于进一步考察。

致谢 在野外样品采集过程中,中国地质大学(北京)杨桂芳老师及其学生和中国地质大学(武汉)冯亮老师及刘邓博士给予了大量的帮助;在溶解有机碳的测试工作中,同济大学葛黄敏给予了无私的帮助。在此一并表示衷心的感谢!

参考文献

- [1] Wu J, Huang J, Han X, Gao X, He F, Jiang M, Jiang Z, Primack RB, Shen Z. Shen Three-Gorges Dam-experiment in habitat fragmentation? *Science*, 2003, 300: 1239-1240.
- [2] 胡小琴,姜翠玲,裴海峰,谢向前. 水环境变化对中华鲟的影响. *水电能源科学(water resources and power)*, 2009, 27(3): 35-37.
- [3] 陈芳清,谢宗强. 濒危植物疏花水柏枝对模拟夏季水淹的生理生化响应. *热带亚热带植物学(Journal of Tropical and Subtropical Botany)*, 2009, 17(3): 249-253.
- [4] Xie P. Three-Gorges Dam; risk to ancient fish. *Science*, 2003, 302: 1149-1151.
- [5] Sekiguchi H, Koshikawa H, Hiroki M, Murakami S, Xu K, Watanabe M, Nakahara T, Zhu M, Uchiyama H. Bacterial distribution and phylogenetic diversity in the Changjiang estuary before the construction of the Three Gorges Dam. *Microbial ecology*, 2002, 43: 82-91.

- [6] Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, Xu B, Uchiyama H. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 5142-5150.
- [7] Dang H, Zhang X, Sun J, Li T, Zhang Z, Yang G. Diversity and spatial distribution of sediment ammonia-oxidizing crenarchaeota in response to estuarine and environmental gradients in the Changjiang Estuary and East China Sea. *Microbiology*, 2008, 154: 2084-2095.
- [8] Gong G, Chang J, Chiang KP, Hsiung TM, Hung CC, Duan SW, Codispoti LA. Reduction of primary production and changing of nutrient ratio in the East China Sea; effect of the Three Gorges Dam. *Geophysical Research Letters*, 2006, 33: L07610.
- [9] Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Brock Biology of Microorganisms*. 12 ed. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings, 2008.
- [10] You J, Das A, Dolan EM, Hu Z. Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water Research*, 2009, 43: 1801-1809.
- [11] Moser DP, Onstott TC, Fredrickson JK, Brockman FJ, Balkwill DL, Drake GR, Piffner SM, White DC, Takai K, Pratt LM. Temporal shifts in the geochemistry and microbial community structure of an ultradeep mine borehole following isolation. *Geomicrobiology Journal*, 2003, 20: 517-548.
- [12] Jiang H, Dong H, Yu B, Lv G, Deng S, Berzins N, Dai M. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in Qinghai Lake, northwestern China. *Geomicrobiology Journal*, 2009, 26: 199-211.
- [13] Jiang H, Huang Q, Dong H, Wang P, Wang F, Li W, Zhang C. RNA-based investigation of ammonia-oxidizing archaea in hot springs of Yunnan Province, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76: 4538-4541.
- [14] 黄秋媛, 蒋宏忱, 张传伦, 李文均, 邓诗财, 于炳松, 董海良. 云南地区热泉中氨氧化菌丰度对环境条件的响应. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50(1): 132-135.
- [15] Rotthauwe JH, Witzel KP, 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: 4704-4712.
- [16] Francis C, Roberts K, Beman J, Santoro A, Oakley B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102: 14683-14688.
- [17] Schloss PD, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 1501-1506.
- [18] Konneke M, Bernhard A, De la Torre J, Walker C, Waterbury J, Stahl D. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437: 543-546.
- [19] Zhang R, Liu B, Lau S, Ki J, Qian P. Particle-attached and free-living bacterial communities in a contrasting marine environment: Victoria Harbor, Hong Kong. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 61: 496-508.
- [20] Martens-Habbena W, Berube P, Urakawa H, de La Torre J, Stahl D. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature*, 2009, 461: 976-981.
- [21] Erguder T, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia oxidizing archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33: 855-869.

Structure of planktonic ammonia-oxidizing community in the waters near the Three Gorges Dam of the Yangtze River

Liuqin Huang¹, Hongchen Jiang^{1*}, Shang Wang¹, Chuanlun Zhang^{2,3},
Hailiang Dong^{1,4*}

¹State Key Laboratory of Geological Processes and Mineral Resources, China University of Geosciences, Geomicrobiology Laboratory, Beijing 100083, China

²State Key Laboratory of Marine Geology, Tongji University, Shanghai 200092, China

³Department of Marine Sciences, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA

⁴Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology of Ministry of Education, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China

Abstract: [**Objective**] Investigation of ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in natural environments is of great importance to understand global nitrogen cycling. However, little is known about the effects of dam constructions on the AOM community. We studied the diversity of the free-living and particle-attached AOM populations in the waters behind and in front of the Three Gorges Dam of the Yangtze River, and analyzed the possible correlation between the observed difference in the two fractions of AOM with the environmental parameters. [**Methods**] Two sampling locations near the Three Gorges Dam were selected: one behind and the other in front of the dam. Physicochemical profiles of waters at each location were measured, and the biomass in the waters was collected by filtration. The diversity of AOM in the collected samples was investigated by using an integrated approach including reverse transcription and clone library construction. [**Results**] The turbidity, dissolved oxygen, and redox potential of the water in front of the dam were higher than those behind the dam. The AOM population behind and in front of the dam was dominated by ammonia-oxidizing archaea, whereas the ammonia-oxidizing bacteria were not detected. The distribution of free-living and particle-attached AOA behind and in front of the dam was different; the particle-attached AOA behind the dam was more diverse than that in front of the dam, whereas the free-living AOA showed the opposite tendency; the difference between the fractions of AOA behind the dam was apparently higher than that in front of the dam. [**Conclusion**] The dominant AOA population did not show significant variation in the waters behind and in front of the dam, whereas the altered water dynamics resulted from the TGD construction may change the distribution of free-living and particle-attached AOA fractions in the waters behind and in front of the dam.

Keywords: the Three Gorges Dam, ammonia oxidation, ammonia-oxidizing archaea, community

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Research Funds of State Key Laboratory of Geological Processes and Mineral Resources of China University of Geosciences-Beijing (GPMR2008K08B and GPMR200844), by the Research Funds from the Three Gorges Research Center for geo-hazard, Ministry of Education, China University of Geosciences - Wuhan (TGRC201023), by the 111 projects of China (Nos. B07011 and B08030) and by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry.

* Corresponding authors. Tel: + 86-10-82334651; Fax: + 86-10-82322175; E-mail: Hongchen.jiang@ gmail. com, dongh@ cugb. edu. cn

Received: 6 June 2010 / Revised: 8 September 2010