

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(5):667–675; 4 May 2011
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

淡水富营养型湖泊沉积物亚硝酸还原酶基因(*nirS*)的多样性和系统发育

程占冰, 杨江科*, 李鹤, 朱兵, 陈相军, 闫云君*

分子生物物理教育部重点实验室, 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074

摘要:【目的】以亚硝酸盐还原酶基因(*nirS*)为分子标记, 探讨富营养化湖泊武汉东湖沉积物中 NirS 类反硝化细菌群落的多样性及系统发育, 并分析环境因子对群落分布的影响。【方法】在武汉东湖 4 个典型子湖郭郑湖、汤菱湖、团湖和庙湖采集沉积物样品, 测定环境参数; 提取沉积物中微生物群落基因组 DNA, 分别构建 4 个子湖的反硝化微生物的 *nirS* 基因文库, 利用限制性片段长度的多态性分析 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 技术初步分群, 确定各群的代表菌株并测定其 *nirS* 基因序列; 利用 DOTUR 软件计算各群落多样性和丰富度指数, 以 Neighbor-Joining 法构建供试菌与参比菌的系统发育树。【结果】环境参数测定结果表明东湖 4 个子湖中庙湖沉积物总氮 (TN) 和氨态氮 ($\text{NH}_4^+ - \text{N}$) 含量最高, 团湖最低, 郭郑湖沉积物中 NO_3^- 浓度最高。基于 NirS 序列的生物多样性和丰富度分析表明团湖生物多样性和丰富度指数最高而庙湖各项指数均较低。各子湖供试序列及其代表序列综合 RFLP 聚类分析表明, 武汉东湖沉积物中 NirS 类反硝化微生物种群具有丰富的多样性。NJ 系统发育分析表明东湖沉积物 NirS 类反硝化菌群可分成 3 个较大群体 (群 I–III)。群 I 占总群体的 67.7%, 广泛分布于不同的生态环境; 来自郭郑湖代表菌的 81% 分布于群 I, 而庙湖的代表菌中 65% 分布于群 II。比较分析发现来自于东湖和人工湿地两种生境的 NirS 群落间具有较高的相似性。【结论】武汉东湖淡水富营养型湖泊沉积物中亚硝酸还原酶基因(*nirS*)具有丰富的多样性。东湖沉积物中 TN、 NH_4^+ 和 NO_3^- 的浓度可能是影响 NirS 类反硝化微生物多样性和空间分布的重要因素之一。

关键词: *nirS* 基因, 反硝化细菌, 富营养化湖泊, 限制性片段长度的多态性 (RFLP), 系统发育

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 05-0667-09

反硝化作用是微生物在厌氧条件下将硝酸盐或亚硝酸盐还原成 NO 、 N_2O 或 N_2 的过程。在生态系统中, 反硝化作用是固定氮流失的主要生物学途径, 并在温室气体 (N_2O 、 NO) 产生和环境污染治理中具有重要的作用。完整的反硝化作用过程 (硝酸盐转换成 N_2) 主要是通过硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原

酶、 NO 还原酶和 N_2O 还原酶这 4 种酶共同参与完成的^[1–3]。在细菌代谢途径中, 亚硝酸盐还原酶是反硝化过程的关键酶, 作用主要是将 NO_2^- 还原为 NO 。该酶主要分布于细菌的周质空间^[1, 3], 可分为两种不同的类型——细胞色素 cd1-亚硝酸盐还原酶 (NirS) 和 Cu-亚硝酸盐还原酶 (NirK), 分别由 *nirS*

基金项目: 国家“十一”863 计划课题 (2007AA05Z417)

* 通信作者。Tel: +86-27-87792214; Fax: +86-27-87792213; E-mail: jiangke_yang@yahoo.com.cn; yanyunjun@tom.com.

作者简介: 程占冰 (1984–), 男, 河南人, 硕士研究生, 从事微生物生物化学与分子生物学研究。E-mail: zhanbingcheng@yahoo.cn

收稿日期: 2010-11-22; **修回日期:** 2010-01-13

和 *nirK* 基因编码^[2, 4]。

反硝化微生物类群具有丰富的多样性。传统的以细菌培养性状为依据来研究微生物群落结构的方法难以对微生物群落多样性分析提供准确、充足的信息。而基于 16S rRNA 基因序列的方法具有异质性,不能直接反映微生物的代谢与生理功能^[5]。目前,反硝化作用过程的关键酶基因——*nirS* 基因作为反硝化微生物的功能性分子标记已广泛应用于海洋^[6]、海湾^[7]、湿地^[8-9]、森林^[9]等生态环境的研究。

武汉东湖是长江中下游的一个中型浅水性湖泊,流域面积 187 km²,由多个大小不同的子湖组成。至上世纪 80 年代以来,由于快速工业化和人类活动的加剧,东湖受到越来越严重的污染,并迅速退化为典型的富营养化型湖泊^[10-12]。目前尚缺乏对陆地淡水水域富营养化湖泊环境反硝化微生物群落的分子生态学研究。本实验以亚硝酸还原酶基因(*nirS*)为分子标记,研究武汉东湖 4 个主要湖区沉积物中 *NirS* 类反硝化细菌的组成和系统发育多样性,并初步探讨了 *NirS* 类反硝化菌与沉积物氮素含量间的相互关系;丰富对反硝化细菌群落结构和功能的认识,并为淡水环境保护及污染治理等领域的研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 样品采集和环境因子分析

东湖^[13](114°23'E, 30°22'N)位于武汉市武昌区东北部,最大水深 4.75 m,平均水深 2.21 m,年平均气温 18.3℃,年均水温 18.5℃。2009 年 9 月,本室以武汉东湖郭郑湖(G7)、汤菱湖(TL)、团湖(T)和庙湖(M)4 子湖中心为基点采用五点取样法采集各子湖湖底沉积物(如图 1)。沉积物被迅速 4℃ 保存并带回实验室。部分底泥保存于 -80℃ 备用,剩余部分离心并收集间隙水。总氮、氨态氮、硝酸盐氮和亚硝酸盐氮的含量的测定依照中华人民共和国国家标准(GB11894-89, HJ535-2009, HJ/T346-2007, GB7493-87)进行。

1.2 主要试剂和仪器

Power Soil DNA Isolation Kit 购自 MO BIO Laboratories 公司;蛋白胨,酵母提取物为 OXOID 产品;Ampicillin、IPTG、X-gal 为 Promega 产品;Taq DNA

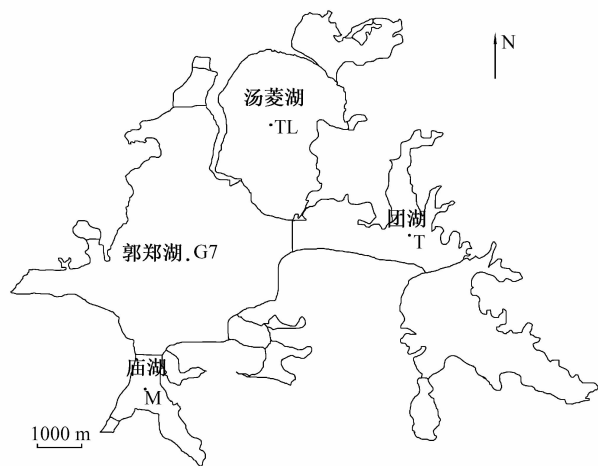


图 1 武汉东湖采样点位置

Fig. 1 The sites of samples collected in the East Lake, Wuhan.

聚合酶、dNTP 购于 Fermentas 公司;pMD18-T simple kit、限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hha* I 购自 TaKaRa 公司;DNA Marker、Plasmid Mini Kit I 和 Gel Extraction Kit 购于 Omega 公司;其他试剂均为进口或国产分析纯产品。PCR 仪为 Eppendorf 5333 型(Hamburg, Eppendorf),凝胶成像系统为 Gel Logic 200 型(Eastman Kodak Company, USA)。

1.3 沉积物微生物总 DNA 的提取、*nirS* 基因的 PCR 扩增及克隆文库的构建

称量 0.25 - 0.3g 湖底沉积物,提取沉积物微生物总 DNA。方法参照 Power Soil DNA Isolation Kit 使用说明。

nirS 基因片段(约 890bp)PCR 扩增的引物为 *nirS1F* (5'-CCTAYTGCCGCCRCART-3') 和 *nirS6R* (5'-CGTTGAACCTTRCCGGT-3'), 扩增程序参照 Braker 等^[14]的描述;扩增产物使用 Gel Extraction Kit (Omega) 回收。胶回收后的目的产物克隆至 pMD18-T simple 载体,转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Top 10 感受态细胞,采用蓝白斑筛选的方法选取阳性克隆子,构建克隆文库。

1.4 *nirS* 基因片段的限制性片段长度的多态性分析

自郭郑湖、汤菱湖、团湖和庙湖 *nirS* 克隆文库分别随机选取 100 个左右的克隆子,分别提取各克隆的质粒 DNA,并以之为模板,以 RV-M (5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') 和 M13-47 (5'-CGCCAGGGTTTCCCACTCAGCAG-3') 为引

物^[15],扩增 *nirS* 基因片段。PCR 扩增反应程序为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 6 min; 4℃ 保存。限制性内切酶 *Msp* I 单酶切 PCR 产物,并取 15 μL 酶切产物于 15% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离 2.5 h,并通过凝胶成像系统 Gel Logic 200 采集指纹图像。采用最简匹配法 (Simple Match) 将限制性片段长度的多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 电泳图谱转换成数值矩阵,在 NTSYS-pc 软件的辅助下,采用 UPGMA 法获得供试菌株的聚类树状图。基于聚类分析结果,从各个文库选择具有代表性的克隆,送至北京天一辉远生物科技有限公司对 *nirS* 片段进行序列分析。

1.5 系统发育分析

利用 DNAMAN 软件将 *nirS* 基因序列翻译成氨基酸序列。在 DOTUR 软件的辅助下,供试群体依照 *NirS* 氨基酸序列 (95% 相似性) 划分为不同的操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU),并计算每个子湖基点反硝化菌群物种多样性指数 (Shannon-Weiner, Simpson) 和丰富度指数 (Abundance-based Coverage Estimator, ACE; Bias-

corrected, Chao1; Eveness, Jack);采用 Kimura-2 参数模型计算遗传距离,通过 Neighbor-Joining 法,利用 PHYLIP 3.69 软件包 (<http://www.phylip.com/>) 构建系统发育树。

1.6 GenBank 登录号

本次研究所得序列 GenBank 登录号: HQ 427886-HQ 428028。

2 结果和分析

2.1 样品采集和环境参数

采集自武汉东湖 4 个子湖沉积物样品的环境数据见表 1。如表 1 所示,4 个子湖的总氮和各无机氮的含量均较高,其中 M 样点的总氮量 (TN) 高达 21.79 mg/L,呈重度富营养型,远高于其它子湖 (呈轻度富营养型)。本研究的测定结果与 2006 年至 2009 年的监测结果相一致 (<http://www.whdonghu.com/news/hjbh/Index.html>; <http://www.whepb.gov.cn/publish/whhbj/2010-03/12/1201003120929040097.html>)。

表 1 采样点环境参数

Table 1 Environmental parameters at the sampling sites.

Station	<i>T_m</i> /℃	pH	<i>c</i> (TN)/ (mg/L)	<i>c</i> (NH ₄ ⁺ - N)/ (mg/L)	<i>c</i> (NO ₃ ⁻ - N)/ (mg/L)	<i>c</i> (NO ₂ ⁻ - N)/ (mg/L)	<i>c</i> NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻ / ratio
G7	29 ± 0.11	7.38 ± 0.05	3.18 ± 0.15	0.34 ± 0.057	0.265 ± 0.070	0.0029	1.283
TL	28.5 ± 0.14	7.45 ± 0.04	2.44 ± 0.02	0.24 ± 0.034	0.117 ± 0.015	0.0035	2.051
T	28 ± 0.13	7.45 ± 0.06	2.14 ± 0.08	0.07 ± 0.008	0.119 ± 0.006	0.0035	0.588
M	29 ± 0.15	7.28 ± 0.04	21.79 ± 0.27	1.26 ± 0.082	0.13 ± 0.012	0.0044	9.69

G7, Guozheng lake; TL, Tangling lake; T, Tuan lake; M, Miao lake.

2.2 沉积物反硝化细菌 nirS 基因的 RFLP 分析

分别以来自汤菱湖、郭郑湖、团湖和庙湖等 4 个子湖沉积物的微生物总 DNA 为模板,PCR 扩增约 890bp 的 *nirS* 基因片段,克隆至 pMD18-T simple 载体、转化,构建了 4 个子湖的 *nirS* 基因克隆文库。从克隆文库中分别随机挑取 119、100、105 和 97 个克隆,以 RV-M 和 M13-47 为引物扩增 *nirS* 基因片段,经 *Msp* I 酶切、电泳并获得指纹图谱。*nirS* 基因指纹图谱经 UPGMA 法进行聚类分析。在 88% 的相似性水平,源于汤菱湖的克隆被可分为 11 个群,其中 102 个菌株 (占总数的 85.7%) 集中分布于群 I; 来源于郭郑湖的克隆被可分为 29 个群,源自团湖的

克隆被可分为 40 个群,来源于庙湖得克隆被可分为 23 个群。

综合每个遗传群代表性序列的指纹图谱,利用平均连锁法构建 4 个子湖的综合聚类分析树状图 (图 2)。如图所示,东湖沉积物 *NirS* 类反硝化微生物具有较为丰富的多样性。选取的 102 个代表菌在 86.6% 的相似性水平可以分为 9 个群。群 I 和群 II 最大,群 I 包含 57 个序列,占总数 55.9%,该群可分为 4 个亚群;群 II 包含 24 个序列,占总数 23.5%,可进一步分 3 个亚群,其中亚群 II-A 最大,共有 16 个供试序列。其余 21 个供试序列分布于群 III-IX 内。

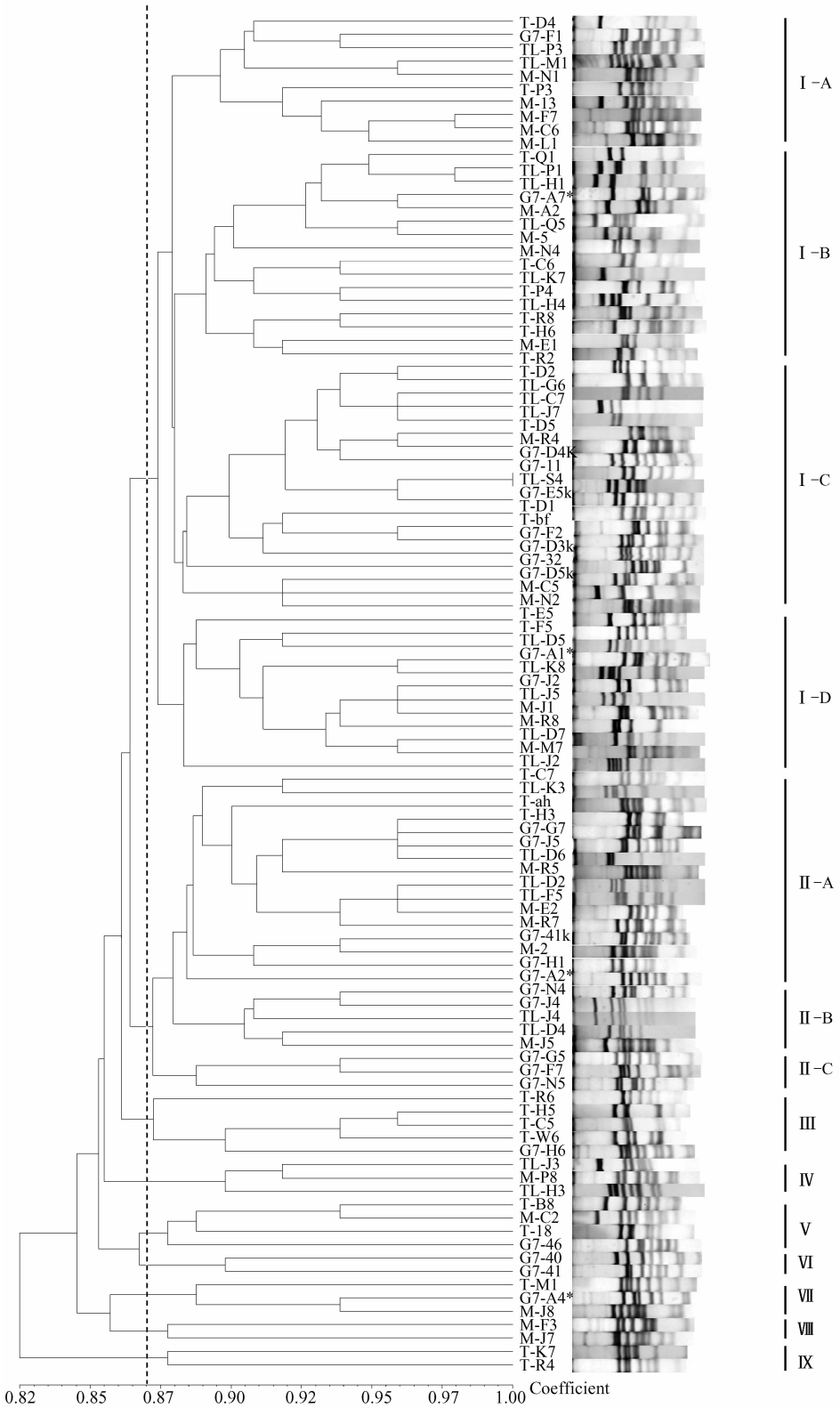


图 2 武汉东湖代表性反硝化细菌 *nirS* 基因 RFLP 分析的 UPGMA 树状图

Fig.2 Dendrogram of representatives from the four *nirS* clone libraries of East Lake, Wuhan generated by using UPGMA method.

2.3 nirS 基因多样性及系统发育分析

基于 *nirS* 氨基酸序列的东湖各站点反硝化细菌生物多样性及丰富度指数见表 2。如表所示,T 样点(团湖)除 Jackknife 指数相对 G7 样点低,其余指数均最高,表明团湖反硝化微生物群体的物种多样性和丰富度在 4 个子湖中最高;TL 样点(汤菱湖)各

项指数最低,表明其物种丰富度和多样性在 4 个子湖中最低;G7(郭郑湖)和 M 样点(庙湖)相比,Shannon-Weiner 指数和 Simpson 指数均低于 M 样点,而丰富度指数高于 M 样点,说明郭郑湖反硝化细菌物种多样性低于庙湖,而丰富度和均匀度高于后者。

表 2 基于 NirS 序列的武汉东湖 4 个子湖反硝化细菌生物多样性和丰富度指数
Table 2 Biodiversity and predicted richness of the sedimentary bacterial NirS sequences recovered from the four sampling sites in the East Lake, Wuhan

Station	No. of clones	No. of OTUs ^a	Simpson(1/D)	Shannon-Weiner (H)	Chao1	ACE	Jackknife
G7	32	21	29.18	2.90 ± 0.28	56.0	49.5	70.4
TL	33	21	26.71	2.89 ± 0.16	34.0	39.7	34.2
T	42	28	43.05	3.21 ± 0.24	56.5	57.6	60.4
M	35	23	31.32	2.99 ± 0.26	38.0	47.7	38.3

^a OTUs of the NirS were determined as the amino acid sequence similarity of 95%.

在 PHYLIP 软件辅助下,本研究通过 Neighbor-Joining 法构建了基于 NirS 氨基酸序列的反硝化细菌的系统发育树(图 3)。由图 3 可知,供试序列在系统发育关系上明显分成三个主要的类群(群 I-III)。群 I 包含 63 个 OTUs,占总群体的 67.7%。该群可进一步分为 4 个亚群(I A、I B、I C 和 I D)。亚群 I-A 包含 33 个 OTUs,占群体总数的 35.5%。此亚群所包括的序列均来自于非培养微生物。该群供试 NirS 序列与来自韩国自然湿地土壤、西班牙人工湿地沉积物^[15]及美国切萨皮克湾沉积物的参比 NirS 序列具有很高的同源性;亚群 I-B 包含 12 个 OTUs,与来自我国胶州湾^[7]、长江口及土壤等环境的参比序列具有相似性。同时,供试菌株 TL-B4 与 *Azoarcus toluolyticus* (AAL86941) 有 75% 的相似度。亚群 I-C 仅包含 3 个分别来自 T 样点、M 和 G7 样点的 OTUs。它们与来自美国切萨皮克湾沉积物环境参比序列有 91% - 93% 相似性。亚群 I-D 包含 6 个 OTUs。该群供试序列与美国切萨皮克湾沉积物的参比 NirS 序列相似度在 77% - 98% 之间,与菌株 *Brachymonas denitrificans* (ABI96831)、*Ralstonia eutropha* H16 (CAA62740)、*Cupriavidus pauculus* (ADN28073)、*Rubrivivax gelatinosus* (BAJ16230) 和 *Azoarcus toluolyticus* Tol 4 (AAL86940) NirS 序列也有一定的相似性。

群 II 包含 37 个 OTUs,占群体总数的 39.8%。与群 I 序列比对结果类似,群 II 供试序列与来自湿地、土壤和海湾沉积物等环境的参比序列有很高的相似性。值得注意的是,该群主要由来自 T 样点、

TL 和 M 样点的代表序列组成,而来自 G7 样点的供试序列只有 3 个。群 II 可进一步分为 3 个亚群(II A-C)。亚群 II-A 供试序列同来自土壤、人工湿地^[16]沉积物环境参比序列相似性为 73% - 99%,与参比菌株 *Azoarcus evansii* KB740 (AAL86938)、*Thauera terpenica* 21Mol (AAL86936) 及 *Pseudomonas stutzeri* LYS-86 (ADD51362) 的 NirS 序列有 77% - 83% 的相似性。亚群 II-B 包含 13 个供试序列。它们与来自切萨皮克湾沉积物环境参比序列相似性为 78% - 94%,与参比菌株 *Azospirillum brasilense* Sp7, DSM1690(CAA12215) NirS 序列相似性约 75% - 81%。亚群 II-C 包含 15 个 OTUs。该群均为非培养微生物。此亚群供试序列与湿地土壤及长江入海口等生态域参比序列有 60% - 98% 相似性。

群 III 只包含 2 个 OTUs,分别来自 G7 和 TL 样点。该群与我国长江入海口环境参比序列间相似性为 79%,与菌株 *Rhodanobacter sp.* D206a (BAH90680) 有 70% - 73% 的相似性。

基于 NirS 序列的系统发育分析与前述 RFLP 分析结果在整体上相对应。RFLP 群 I 和 NirS 系统发育树的群 I 相对应,RFLP 群 IV-V 及亚群 II-A 与 NirS 系统发育树的群 II 相对应。但在较低层次的亚群和小群的聚类上,两种分析方法有一定的差异。究其原因,这主要是由于 RFLP 的主要功能是对群体进行初步分群。尽管两种方法都能在不同层次上提供群体多样性和系统发育的信息,但基于 NirS 氨基酸序列的系统发育分析提供的信息更丰富、更准确。另一方面,RFLP 图谱的制作更大程度上基于

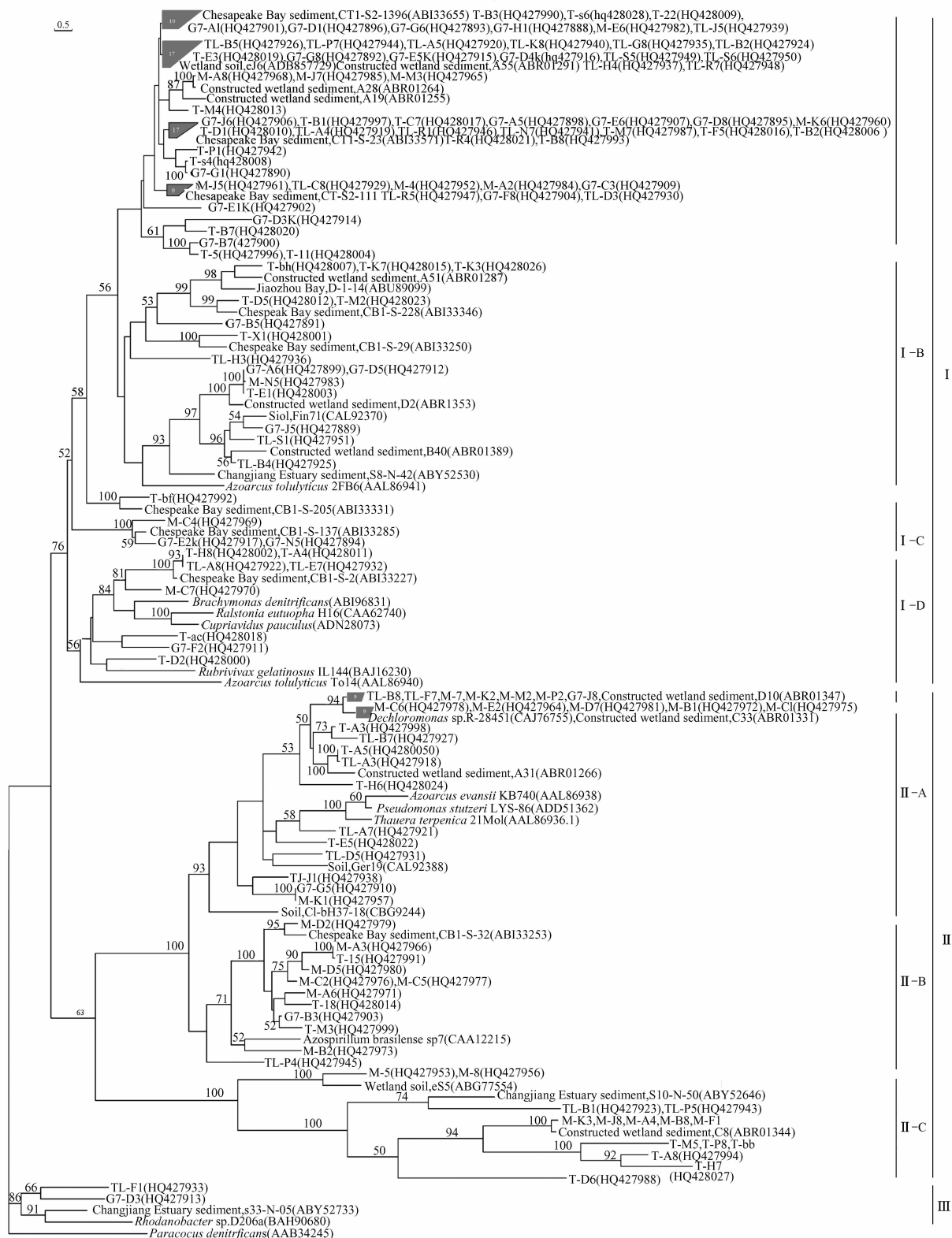
图3 基于 *NirS* 氨基酸序列的系统发育图

Fig. 3 Neighbor-joining tree based on retrieved *nirS* sequences from GenBank and translated *nirS* sequences (ca. 290 residues) of the representatives of each OUT that was determined at 5% cut off. Bootstrap values above 50% for 500 replicates are shown at branch points. The sequence of *Paracoccus denitrificans* was used as an outgroup. Abbreviations: G7, Guozheng lake; TL, Tangling lake; T, Tuan lake; M, Miao lake.

核苷酸序列的信息,而本文系统发育树的制作是基于氨基酸序列信息。作为功能基因的 NirS,其核苷酸水平和氨基酸水平进化的异质性(不同步)也会导致两种分析方法的细小差异。本实验中两种分析方法上存在的差异,在更大程度上也反映了东湖反硝化群体遗传多样性及系统演化的渐进性。

3 讨论

反硝化微生物群落结构和系统发育与环境条件具有密切相关性。研究表明,诸多环境因子(如 NO_3^- 、 NH_4^+ 、 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 和 OrgC/OrgN)的变化影响到反硝化微生物群体的结构和空间分布^[7,17-18]。本研究中,在所有供试子湖中团湖的物种丰富度指数(ACE)、均匀度指数(Jackknife)和多样性指数(Shannon-Weiner)均最高(表2),所对应沉积物的 TN 、 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 均最低(表1)。相反,庙湖污染程度最高, TN 和 NH_4^+ 浓度显著高于其它子湖,而群落多样性和丰富度指数均较低。另一方面,系统发育分析表明来自于轻度富营养化的郭郑湖的 NirS 类群体中,约 81% 的代表序列分布于群 I;而来自重度富营养化型庙湖的群体中,约 65% 的代表序列分布在群 II 中(在亚群 II-A/B 中尤为明显)。可见东湖沉积物中 TN 、 NH_4^+ 和 NO_3^- 含量对 *nirS* 反硝细菌具有较强的选择性,可能是导致反硝化微生物群落多样性及空间分布的重要影响因素。

NirS 序列系统发育分析表明,东湖沉积物反硝化细菌与湿地^[16]、土壤、海湾^[9]、江河入海口等生态环境的细菌群体都具有较高的相似性(图3)。NirS 群体中,群 I 特别是亚群 I-A 不仅在整个供试群体中所占比例最大,而且包含了来自不同生境的参比序列。可见群 I 反硝化细菌具有广泛的环境适应性。进一步的分析表明,供试序列与人工湿地^[16]在系统发育拓扑结构上相似度较高,均主要分布于群 I 和群 II 两大类群(图3)。说明富营养化环境反硝化微生物间可能具有进化上的趋同性。

富营养化是我国湖泊面临的重要环境问题。氮素是促使水体富营养化的主要营养元素之一。通过

反硝细菌的纯培养物或原位激活反硝化细菌对污染水体的生物修复是解决水体富营养化的有效途径^[19-20]。由本研究可知,富营养化的东湖沉积物中 NirS 类反硝化微生物具有较丰富的多样性,这可为新型反硝化菌的分离研究提供资源。另一方面,水体富营养化程度不同,反硝化细菌的群落结构也各异。因此,在对不同的水体进行原位生物修复或从不同的沉积物样品中分离反硝化细菌时,为了得到最优的结果就应该根据营养状况的差异而采用不同的策略。

综上所述,东湖沉积物中 NirS 类反硝化微生物群落具有较丰富的多样性,且其多样性和丰富度受沉积物氮素浓度的影响,较高的 TN 、 NH_4^+ 、 NO_3^- 浓度可能是影响湖泊沉积物反硝化细菌空间选择性和多样性的重要因素之一。富营养化东湖沉积物环境 NirS 类反硝化细菌的研究不仅丰富了我们反硝化细菌群体结构多样性和系统发育的认识,而且对湖泊污染的微生物生态修复等研究具有借鉴意义。

参考文献

- [1] Berk BC, Ferguson SJ, Moir JW, Richardson DJ. Enzyme and associated electron transport systems that catalyze the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, 1232 (3): 97-173.
- [2] Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews*: MMBR, 1997, 61(4): 533-616.
- [3] Knowles R. Denitrification. *Microbiological Reviews*, 1982, 46 (1): 43-70.
- [4] Glockner AB, Jüngst A, Zumft WG. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd 1 -free background (NirS) of *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of microbiology*, 1993, 160 (1): 18-26.
- [5] Zumft WG. The denitrifying prokaryotes. // Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (ed.). The prokaryotes. 2nd ed. New York, N. Y.: Springer Verlag, 1992: 554-582.

- [6] Braker G, Zhou J, Wu L, Devol AH, Tiedje JM. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5) : 2096-2104.
- [7] Dang H, Wang C, Li J, Li T, Tian F, Jin W, Ding Y, Zhang Z. Diversity and distribution of sediment *nirS*-encoding bacterial assemblages in response to environmental gradients in the eutrophied Jiaozhou Bay, China. *Microbial Ecology*, 2009, 58(1) : 161-169.
- [8] Yan T, Fields MW, Wu L, Zu Y, Tiedje JM, Zhou J. Molecular diversity and characterization of nitrite reductase gene fragments (*nirK* and *nirS*) from nitrate- and uranium-contaminated groundwater. *Environmental Microbiology*, 2003, 5 (1) : 13-24.
- [9] Priemé A, Braker G, Tiedje JM. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (4) : 1893-1900.
- [10] 贺华中. 东湖主要点源氮、磷负荷的动态变化. 湖泊科学 (*Journal of lake sciences*), 1996, 8(3) : 229-234.
- [11] 刘建康, 黄祥飞. 东湖生态学研究概况. 环境科学 (*Environmental Science*), 1997, 18; 51-53.
- [12] 杨洪, 易朝路, 谢平, 邢阳平, 倪乐意. 武汉东湖沉积物碳氮磷垂向分布研究. 地球化学 (*Geochimica*), 2004, 33(5) : 507-514.
- [13] 刘建康. 东湖生态学研究 (一). 北京: 科学出版社, 1990: 379-387.
- [14] Braker G, Fesefeldt A, Witzel KP. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (10) : 3769-3775.
- [15] Qin YY, Li DT, Yang H. Investigation of total bacterial and ammonia-oxidizing bacterial community composition in a full-scale aerated submerged biofilm reactor for drinking water pretreatment in China. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 268(1) : 126-134.
- [16] Ruiz-Rueda O, Trias R, Garcia-Gil LJ, Bañeras L. Diversity of the nitrite reductase gene *nirS* in the sediment of a free-water surface constructed wetland. *International Microbiology*, 2007, 10(4) : 253-260.
- [17] Santoro AE, Boehm AB, Francis CA. Denitrifier community composition along a nitrate and salinity gradient in a coastal aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3) : 2102-2109.
- [18] Tiquia SM, Masson SA, Devol A. Vertical distribution of nitrite reductase genes (*nirS*) in continental margin sediments of the Gulf of Mexico. *FEMS microbiology ecology*, 2006, 58(3) : 464-475.
- [19] Tompkins JA, Smith SR, Cartmell CE, Wheater HS. In-situ bioremediation is a viable option for denitrification of Chalk groundwaters. *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology*, 2001, 34: 111-125.
- [20] 于大禹, 郭威, 张金榜, 张贺, 杨鹏. 好氧反硝化菌的筛选及其脱氮除磷性质的研究. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2009, 36(4) : 598-603.

Phylogeny diversity of the nitrite reductase gene (*nirS*) in the sediments of the eutrophic East Lake, Wuhan

Zhanbing Cheng, Jiangke Yang*, He Li, Bing Zhu, Xiangjun Chen, Yunjun Yan*

Key Laboratory of Molecular Bio-physics, Ministry of Education; College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

Abstract: [**Objective**] The study aims to investigate the phylogeny diversity of the denitrification bacteria communities in the sediments of the eutrophic East Lake, Wuhan based on nitrite reductase gene (*nirS*) restriction fragment length polymorphism (RFLP) method and sequencing analysis, and to analyse community variation according to the environment parameters. [**Methods**] We collected the sediment samples from the four typical sub-lake of East Lake in Wuhan, Guozheng Lake, Tangling Lake, Tuan Lake and Miao Lake, and measured the environmental parameters appropriately. After extracted the genomic DNA from the sediment, four *nirS* gene clone libraries were successfully constructed. The operation taxonomy units (OTUs) were determined by RFLP method and the representative fragment of every OTU was sequenced. The diversity, richness and evenness statistics of the NirS-like communities were calculated by using DOTUR software. Neighbour-joining phylogenetic tree was constructed basing on the amino acid sequences of NirS from the East Lake sediments and reference sequences retrieved from the GenBank database. The relationship between tested NirS communities and the references from different environments was also discussed. [**Results**] Environmental parameters showed that Miao Lake sediment contains the highest amount of total nitrogen (TN) and $\text{NH}_4^+ - \text{N}$, while the Tuan Lake sediments contains the lowest amount. Among the four sub-lakes, Tuan Lake harbours the highest diversity and richness of NirS-like denitrifiers, while the denitrifiers in Miao Lake was the lowest. Phylogenic analyses suggested that sedimentary NirS-like denitrifiers in the East Lake could be distributed into three groups, Group I to III. Group I accounts for 67.7% of all tested communities. Eighty-one percent of sequences from Guozheng Lake were clustered into Group I, while 67.7% of sequences from Miao Lake were clustered into Group II. Comparative analysis of communities from East Lake and artificial wetland found there are phylogenetically related. [**Conclusion**] There are diverse and abundant NirS-like denitrifiers inhabited in the sediments of East Lake, Wuhan. The diversity indices and spatial distribution of these communities are affected by the content of TN, NH_4^+ and NO_3^- nutrients in the sediments.

Keywords: *nirS* gene, denitrification bacteria, eutrophic lake, restriction fragment length polymorphism (RFLP), phylogeny

(本文责编:王晋芳)