



# 珠江口外东澳岛海域 MG I 古菌和藻类的昼夜变化关系的研究

姚文勇<sup>1,2,3</sup>, 陈松泽<sup>1,2,3\*</sup>, 何炜<sup>1,2,3</sup>, 周敬倬<sup>1,2,3</sup>, 张传伦<sup>1,2,3,4\*</sup>

1 南方科技大学, 深圳海洋地球古菌组学重点实验室, 广东 深圳 518055

2 南方科技大学海洋科学与工程系, 广东 深圳 518055

3 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广东 广州 511458

4 上海佘山地球科学国家野外科学观测研究站, 上海 201600

姚文勇, 陈松泽, 何炜, 周敬倬, 张传伦. 珠江口外东澳岛海域 MG I 古菌和藻类的昼夜变化关系的研究. 微生物学报, 2022, 62(6): 2340–2352.

Yao Wenyong, Chen Songze, He Wei, Zhou Jingzhuo, Zhang Chuanlun. Diurnal variation of marine group I archaea and algae at Dong'ao island. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(6): 2340–2352.

**摘要:** 【目的】海洋古菌 MG I (marine group I archaea) 是海洋中主要微生物类群, 拥有利用氨氮进行氨氧化自养的能力, 是海洋环境中氨氧化过程的重要参与者。研究 MG I 古菌的昼夜变化规律, 对揭示海洋中氨氧化过程以及碳氮循环有着重要的意义。【方法】此次研究的样品来自于珠江口东澳岛附近海域, 使用无人机采样技术获取了以 2 h 为间隔的 22 h 连续时间序列海水样品。本研究重点关注以下科学问题: (1) 昼夜尺度下珠江口 MG I 古菌与藻类的群落和丰度变化特征; (2) 昼夜尺度下珠江口 MG I 古菌受温度和藻类的影响。本研究通过样品 DNA, 以 qPCR、二代基因测序等

**基金项目:** 大学生创新创业训练计划(2019G08); 广东省攀登计划(pdjh2020c0031); 国家自然科学基金(91851210); 深圳市海洋地球古菌组学重点实验室(ZDSYS 20180208184349083); 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州) (K19313901); 上海佘山地球科学国家野外科学观测研究站(2020Z01)

Supported by the National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (2019G08), by the Special Funds for the Cultivation of Guangdong College Students' Scientific and Technological Innovation (pdjh2020c0031), by the National Natural Science Foundation of China (91851210), by the Shenzhen Key Laboratory of Marine Archaea Geo-Omics, Southern University of Science and Technology (ZDSYS 20180208184349083), by the Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou) (K19313901) and by the Sheshan National Field Scientific Observation and Research Station of Earth Sciences, Shanghai (2020Z01)

\*Corresponding authors. Tel: +86-755-88018622; Fax: +86-755-88018714; E-mail: CHEN Songze, [chensz@sustech.edu.cn](mailto:chensz@sustech.edu.cn), ZHANG Chuanlun, [zhangcl@sustech.edu.cn](mailto:zhangcl@sustech.edu.cn)

Received: 30 June 2021; Revised: 23 August 2021; Published online: 7 September 2021

手段, 结合环境参数(温度、盐度、营养盐浓度等), 以探究海水藻类与 MG I 古菌之间可能存在的关系。【结果】研究发现, MG I 古菌丰度为 $(9.1\pm 3.2)\times 10^7$  copies/L, 藻类的丰度为 $(3.7\pm 0.7)\times 10^8$  copies/L。通过古菌的高通量测序发现 MG I 古菌是该区域最主要的古菌类群(36.2%–50.0%)。在昼夜变化尺度下, MG I 古菌与藻类的丰度表现出一定的负相关关系, 且环境因子中, 温度与 MG I 古菌之间表现出显著的负相关。【结论】基于前人研究我们提出假说: 在昼夜时间尺度下, 温度以及藻类可能是影响河口海洋水体环境中 MG I 古菌变化的重要因素。本研究聚焦 MG I 古菌的昼夜变化规律, 对人类理解海洋尤其是近岸水体中的碳氮循环及对硝化过程认知具有一定的推进作用。

关键词: 海洋古菌; MG I 古菌; 氨氮; 藻类; 昼夜尺度

## Diurnal variation of marine group I archaea and algae at Dong'ao island

YAO Wenyong<sup>1,2,3</sup>, CHEN Songze<sup>1,2,3\*</sup>, HE Wei<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Jingzhuo<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Chuanlun<sup>1,2,3,4\*</sup>

1 Shenzhen Key Laboratory of Marine Archaea Geo-Omics, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, Guangdong, China

2 Department of Ocean Science and Engineering, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, Guangdong, China

3 Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, Guangdong, China

4 Shanghai Sheshan National Earth Science Observation and Research Station, Shanghai 201600, China

**Abstract:** [Objective] MG I (marine group I archaea) are the main microbial group in the ocean, which have the ability to use ammonia nitrogen to carry out ammonia oxidation autotrophic and are one of the main participant ammonia oxidation processes in the marine environment. The study of the diurnal variation of MG I archaea is of great significance for revealing the process of ammonia oxidation and carbon and nitrogen cycling in the ocean. [Methods] Samples for this study were collected from the waters near Dong'ao Island in the Pearl River Estuary, and 22-hour continuous time series of seawater samples were obtained with 2-hour intervals using a drone sampling technology. This study focused on the following scientific issues at the diurnal scale in the Pearl River Estuary: (1) Changes in the community and abundance of MG I archaea and algae. (2) The impacts of light, temperature and algae on the distribution of MG I archaea. DNA extraction, qPCR, second-generation gene sequencing, and other means, combined with environmental parameter tests (temperature, salinity, nutrient concentration, etc.), were used to explore the potential relationship between algae and MG I archaea in seawater. [Results] The abundance of MG I archaea was  $(9.1\pm 3.2)\times 10^7$  copies/L and that of algae was  $(3.7\pm 0.7)\times 10^8$  copies/L. High throughput sequencing of archaea showed that MG I were the most dominant archaeal group (36.2%–50.0%) in this region. At the diurnal scale, there was a negative correlation between the abundance of MG I archaea and algae. [Conclusion] Based on previous studies, we hypothesize that, temperature and algae might be the important factors that regulate the MG I archaea in estuarine marine water at the diurnal scale. This study highlights the diurnal variation of MG I

archaea, which enhances our understanding of the fine-scale nitrification process in the ocean, especially in the nearshore water.

**Keywords:** marine archaea; MG I archaea; ammonia; algae; diurnal scale

古菌占到海洋水体 20% 的原核生物量, 其中, 海洋古菌 MG I (marine group I) 与 MG II (marine group II) 为主要古菌类群, 广泛分布于不同海洋水体环境中。MG I (现称为 Thaumarchaeota) 属于自养型古菌, MG II (现称为 Poseidoniales) 属于异养型古菌。在之前的研究中发现, 珠江口中 MG II 古菌与藻类表现出了较好的正相关关系<sup>[1]</sup>。MG I 是氨氧化古菌 (ammonia oxidizing archaea, AOA), 拥有氨氧化自养能力, 能够利用氨氧化过程释放的能量并吸收二氧化碳进行固碳作用, 在海洋环境中对碳氮循环过程起到举足轻重的作用<sup>[2]</sup>。

MG I 古菌将氨氮氧化产生亚硝酸盐, 这些亚硝酸盐能够在环境中进一步与氧气反应, 最终生成硝酸盐被其他生物所利用。在海水环境中, 氨氮与硝酸盐都是藻类的重要营养盐来源, 能够促进藻类生长。硝酸盐是引发藻类激增, 发生赤潮的主要因素, 但在硝酸盐的代谢通路中, 这些硝酸盐需要经过酶催化, 消耗能量还原成氨氮后才能转入到生物量中<sup>[3]</sup>。Podvin 等对 4 株小球藻的研究发现, 4 株藻 (*Chlorella vulgaris*、*Auxenochlorella protothecoides*、*Chlorella sorokiniana* 和 *Nannochloropsis oculata*) 都可以仅利用氨氮作为氮源, 但其中 *Auxenochlorella protothecoides* 不能在仅有硝酸盐的条件下存活<sup>[4]</sup>。总之, 氨氮是藻类生存的重要因素, 不同藻类可能对水体氨氮和硝酸盐的利用存在差异。

MG I 古菌拥有已知海洋自养生物中几乎最强的氨氮亲和力<sup>[5-6]</sup>, 是寡营养硅藻 *Thalassiosira pseudonana* 的 30 多倍<sup>[7]</sup>。Liu 等指出, 藻类与 MG I 古菌之间可能存在对氨氮的竞争<sup>[8-9]</sup>, 且

MG I 古菌在竞争中处于优势地位<sup>[6]</sup>, 尽管如此, MG I 古菌依然会受到藻类的抑制<sup>[10]</sup>。同时, 海洋表层 MG I 古菌参与的硝化作用可以提供 50% 藻类所需的硝酸盐与亚硝酸盐<sup>[11]</sup>, 促进部分藻类生长。迄今为止, 藻类与 MG I 古菌互作关系的研究还十分有限, 两者种群在海水中的联系尚不明确<sup>[12]</sup>。

河口及毗邻海域是海陆交互作用最活跃的地区, 是碳、氮等生物地球化学元素循环的重要区域。珠江口位于粤港澳大湾区, 是重要的海产养殖区和渔场, 珠江口水体富营养化带来的相关环境事件多发 (如赤潮), 环境问题迫切需要解决<sup>[13-14]</sup>。水体藻类与 MG I 古菌在驱动碳氮循环和维持海洋生态系统平衡中起到了重要作用<sup>[15-16]</sup>。因此, 研究珠江口水体藻类与 MG I 古菌的关系对人类理解元素循环、能量流动、改善海水环境及治理海洋富营养化很有必要。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

采用 2019 年 11 月 13 至 14 日采集于珠江河口下游东澳岛附近水域 (113.658 028°E, 21.983 961°N) 表层 1 m 水深海水样品。采样使用无人机系统, 相较于常规采样手段, 无人机采样具有便捷性、远程操作性等特点, 能够做到远距离、高频率的采样, 减少人为因素造成的实验误差, 并有效降低采样成本。

采样共获得以 2 h 为时间间隔, 总跨度为 22 h, 体积约为 1 L 的海水样品。获得水样后, 立刻使用 0.22 μm 孔径的 Millipore MCE 滤膜 (GSWP04700) 进行过滤, 所得滤膜保存于康宁

2 mL 冻存管(430659)中用于后续 DNA 提取分析;用康宁 50 mL Nest 离心管(430829)保存 40 mL 滤液用于后续营养盐测试分析。所得滤膜和海水样品采集后立即放入干冰箱,返回实验室后立即转入-20 °C 冰箱保存。

## 1.2 理化参数测定

使用梅特勒-托利多新 SevenGo Duo™ 系列多参数测试仪在现场及时进行温度与盐度的测定。营养盐测定由基于分光光度法的 Cleverchem Anna 全自动化学分析仪完成(铵盐:水杨酸法 HJ 536-2009;硝酸盐:镉柱还原法 GB17378.4-2007;亚硝酸:盐氮乙二胺分光光度法 GB17378.4-2007;磷酸盐:磷钼蓝法 GB17378.4-2007;硅酸盐:硅钼蓝法 GB17378.4-2007)<sup>[17-18]</sup>。

## 1.3 DNA 测序及数据分析

将获得 DNA 送至美格公司,使用 HiSeq PE250 进行测序。古菌 16S rRNA 基因的 V4-V5 区测序引物为 524F10extF: 5'-TG YCA GCCGCCGCGGTAA-3' 和 Arch958RmodR: 5'-YCCGGCGTTGAVTCCAATT-3'<sup>[25]</sup>。藻类 23S rRNA 基因测序采用巢式 PCR,第一轮引物使用 A23SrVF1: 5'-GGACARAAAGACCCTATG-3' 和 A23SrVR1: 5'-AGATCAGCCTGTTATCC-3';第二轮引物采用 A23SrVF2: 5'-CARAAAGACCCTATGMAGCT-3' 和 A23SrVR2: 5'-TCAGCCTGTTATCCCTAG-3'<sup>[26]</sup>。

测序原始下机数据分析在 Qiime2-2020.2<sup>[27]</sup> 软件中进行,使用 DADA2 进行质控<sup>[28]</sup>。古菌与藻类操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)按 99%相似度进行 vsearch-cluster 算法聚类<sup>[29]</sup>,并过滤 reads 数 30 以下的 OTU。使用 Silva-132-99-nb-classifier 分类器对古菌 16S rRNA 序列进行注释<sup>[30]</sup>,藻类注释使用 NCBI 的 BLASTn (认为相似度 99%以上 OTU

为同一物种)功能比对完成<sup>[31]</sup>。在 MEGAX 软件中使用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)完成系统发育树的构建<sup>[32]</sup>,核对分类准确性。

所得序列均已上传至 NCBI 数据库,原始数据的 GenBank 项目序列号为:PRJNA741863。

## 1.4 藻类与 MG I 相关性分析

样品中各种生物类群的丰度计算公式:  $C=A \times B$ 。式中 A 为所属类群在测序结果中所占比例; B 为 qPCR 测试中所得到的总丰度; C 为所属生物类群的丰度。使用 IBM SPSS Statistics 20 软件进行双侧相关性分析<sup>[33]</sup>,用于测定各藻类群与 MG I 之间的相关性、显著性数据,  $P < 0.05$  时认为组间有显著差异。使用 Cytoscape 3.8.2 软件进行 MG I 古菌、藻类与环境参数的网络图绘制<sup>[34]</sup>。

## 1.5 DNA 提取及荧光定量 PCR

使用 MP 的土壤 DNA 提取试剂盒(Fast DNA SPIN KIT FOR SOIL from MP Biomedicals)进行 DNA 提取。荧光定量 PCR 反应采用赛默飞的 QuantStudio™ 5 Real-Time PCR 仪器。反应体系: 5 μL TaKaRa TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus), 0.4 μL 引物, 0.2 μL ROX Reference Dye II, 3 μL ddH<sub>2</sub>O 和 1 μL DNA 样品,总计为 10 μL 反应体系。程序设置: 95 °C 预变性 30 s,随后进入 40 次循环,循环包括 95 °C 变性 5 s, 55 °C 退火 30 s 和 72 °C 延伸 60 s。MG I 古菌定量采用引物 Arch-amoA-F: 5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3' 和 Arch-amoA-R: 5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3'<sup>[19]</sup>;藻类定量采用引物 p23srV-f1: 5'-ACAGAAAGACCCTATGAA-3' 和 p23srV-r1: 5'-AGCCTGTTATCCCTAGAG-3'<sup>[20]</sup>;细菌定量采用引物 BAC338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGAGAG-3'<sup>[21]</sup> 和 BAC805R: 5'-GACTACCAGGGTATCTAATCC-3'<sup>[22]</sup>; MG II 古菌定量采用引物

GII-554-f: 5'-GTCGTTTTATTGGGCCTAA-3'<sup>[23]</sup>和 Eury806-r: 5'-CACAGCGTTTACACCTAG-3'<sup>[24]</sup>。qPCR 数据初步分析使用 QuantStudio™ Design & Analysis 软件(版本号 v 1.5.1.), 反应的扩增效率严格控制在 90%–110%, 标准曲线的  $R^2$  均保持在 0.98 以上。

## 2 结果与分析

### 2.1 环境参数

采样位点的盐度接近海水(30.10‰–34.25‰)。温度在首日下午 15:30 有最高值 23.6 °C, 在次日凌晨 6:46 有最低值 19.9 °C。采样点的各营养盐浓度普遍保持在较低的水平, 是典型贫营养水体<sup>[35]</sup>。水体中的氨氮、硝酸盐以及亚硝酸盐在时间梯度上有明显的变化( $P=0.009$ )。在夜间(18:15–2:19), 氨氮浓度维持在极低的浓度水平(<0.009 mg/L)。在 3:48–11:19, 氨氮浓度在相对较高的范围内(0.008–0.067 mg/L)波动。硝酸盐和亚硝酸盐在绝大多数时间点(15:30–6:46)都保持低浓度(硝酸盐: 0.004–0.010 mg/L, 亚

硝酸盐<0.013 mg/L), 但在上午的数个小时里(8:15–11:19)都有上升(硝酸盐在 0.012 mg/L 左右), 尤其是亚硝酸盐, 从 6:46 的 0.008 mg/L 迅速提升到了 11:19 的 0.191 mg/L (表 1)。

### 2.2 古菌和藻类的丰度及群落变化

MG I 古菌与藻类的昼夜变化明显, MG I 昼低  $[(8.5\pm 3.5)\times 10^6 \text{ copies/L}]$  夜高  $[(1.0\pm 0.2)\times 10^7 \text{ copies/L}]$ , 藻类则有与之相反的变化[昼间:  $(4.2\pm 0.6)\times 10^8 \text{ copies/L}$ , 夜间:  $(3.3\pm 0.5)\times 10^8 \text{ copies/L}]$ , MG I 古菌与藻类的浓度分别是  $(9.1\pm 3.2)\times 10^7 \text{ copies/L}$  和  $(3.7\pm 0.7)\times 10^8 \text{ copies/L}$ 。东澳岛海域 MG I 古菌在白天强光照时期浓度相对夜间较低, 可能是由于 MG I 古菌的生命活动会受到光照的抑制<sup>[36–38]</sup>, 而藻类光合作用对光照的需求则会引起相反的变化。MG II 古菌的丰度在  $(1.3\pm 0.2)\times 10^8 \text{ copies/L}$  附近较为稳定(图 1)。与其他河口地区的结果对比后发现, 该地 MG I 古菌与藻类丰度相对其他河口区域较高(高出 1–2 个数量级), 而 MG II 古菌的丰度水平与其他河口区域接近<sup>[1,39–41]</sup>。

表 1 时间序列样品盐度、温度和营养盐浓度数据表

Table 1 Time series of salinity, temperature and nutrient concentration

Samples	Time	Salinity/ ‰	$T/^\circ\text{C}$	Ammonia/ (mg/L)	Nitrite/ (mg/L)	Nitrate/ (mg/L)	Phosphate/ (mg/L)	Silicate/ (mg/L)
DAD-1	2019-11-13 15:30	33.11	23.2	0.03	0.008	0.004	0.008	0.26
DAD-2	2019-11-13 18:15	33.23	21.2	ND	ND	0.006	0.008	0.17
DAD-3	2019-11-13 21:46	32.72	21.1	ND	0.008	0.006	0.010	0.19
DAD-4	2019-11-13 23:11	32.35	21.1	0.009	0.002	0.005	0.010	0.14
DAD-5	2019-11-14 00:56	33.35	21.4	0.003	ND	0.010	0.008	0.23
DAD-6	2019-11-14 02:19	34.25	20.0	0.008	ND	0.008	0.008	0.18
DAD-7	2019-11-14 03:48	33.97	20.5	0.035	0.007	0.005	0.001	0.26
DAD-8	2019-11-14 05:15	33.44	20.0	0.064	0.013	0.005	0.017	0.12
DAD-9	2019-11-14 06:46	33.06	19.9	0.015	0.008	0.004	0.005	0.24
DAD-10	2019-11-14 08:15	30.14	20.5	0.067	0.041	0.012	0.006	0.36
DAD-11	2019-11-14 09:49	30.10	22.9	0.050	0.103	0.013	0.008	0.39
DAD-12	2019-11-14 11:19	31.09	23.6	0.008	0.191	0.012	0.004	0.22

ND: not detected.

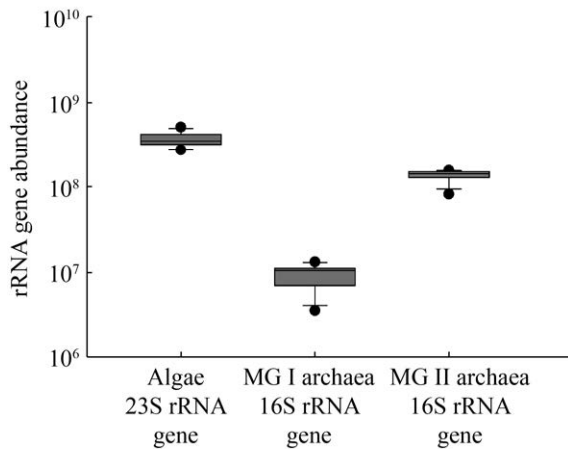


图 1 藻类的 23S rRNA 基因丰度以及 MG I 古菌、MG II 古菌的 16S rRNA 基因丰度

Figure 1 23S rRNA gene abundance of algae, and 16S rRNA gene abundance of MG I archaea and MG II archaea. Black circles in the figure represent the upper and lower boundary. Upper and lower boundary of the bar represents the quartiles, and the line inside the bar shows the median.

MG I 古菌是样品中最主要的古菌类群(占 36.2%–50.0%古菌总量), 其次为 MG II 古菌(占 27.7%–39.4%古菌总量), 两者是中国近海水体中主导的古菌类群<sup>[42]</sup>。纳古菌(Nanoarchaea, 占 15.6%–29.8%古菌总量)在本次研究中也发现, 这类古菌主要出现在沉积物或热液口区域<sup>[43–45]</sup>,

但也有纳古菌在河口水体中出现并占主导地位的现象<sup>[42,46]</sup>。

MG I 古菌在不同时间点上表现的差异最为明显; 纳古菌表现出了一定的变化, 在多数时期稳定在 24.0%左右, 在夜间有一定幅度的降低; 而 MG II 古菌在昼夜变化周期中所占比例相对较为稳定。海水表层的古菌类群常以 MG II 古菌为主, 本次发现的 MG I 古菌在表层海水呈现的优势地位(相较于 MG II)并不常见<sup>[47]</sup>, 可能是河口下游水体含有比开放大洋更高氨氮导致的。

东澳岛海域有较高的藻类多样性。原核藻类蓝藻是东澳岛最高的藻类群(24.1%–43.6%); 真核藻类主要由硅藻(11.1%–21.2%)、甲藻(16.4%–22.1%)、定鞭藻(9.9%–18.2%)、隐藻(6.0%–11.9%)和绿藻(3.0%–4.6%)组成(图 2B)。

### 2.3 MG I 的群落变化

MG I 古菌的 16S rRNA 基因主要由 5 条 OTU 组成(占 99.96% MG I 古菌序列), 比例变化如图 2A 所示。OTU MG I-1 是总量最高的 MG I 古菌类群, 从首日的 15:30 至次日的 0:56 表现出了持续的增长趋势, 有着 20.0%–44.6%的古菌占比, 至 5:15 之后 MG I-1 开始呈下降趋

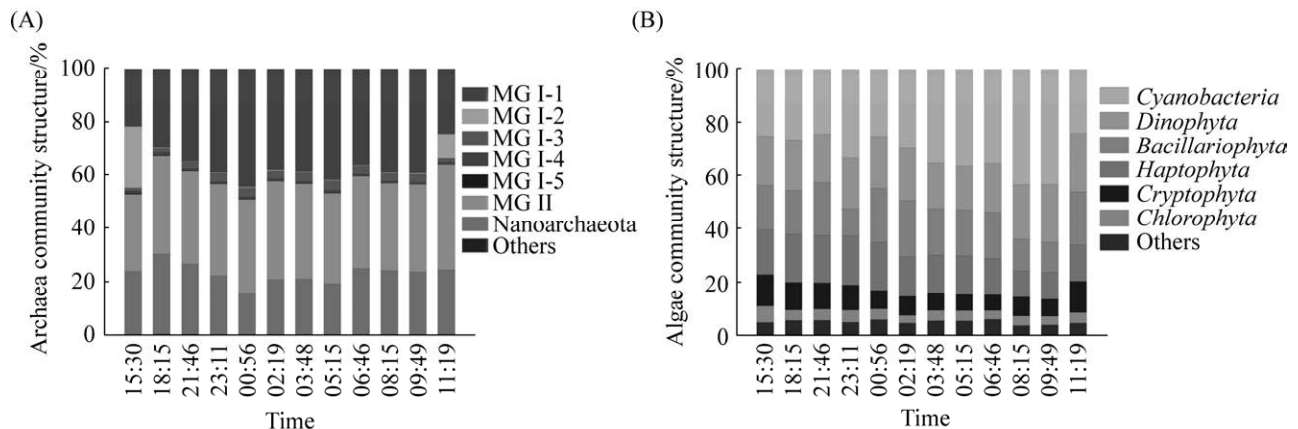


图 2 东澳岛海域时间序列的古菌(A)和藻类(B)群落结构变化

Figure 2 Time series of archaea (A) and algae (B) community structure variation in Dong'ao island (2019.11.13–11.14).

势。OTU MG I-3 的变化趋势与 OTU MG I-1 相似 (占比 1.0%–3.6% 的总古菌), 但 OTU MG I-2 则表现出完全不同的变化规律。OTU MG I-2 在大多数时间点都保持在极低的范围 (占比 0.2%–0.3% 的总古菌), 而在首日的 15:30 (占比 23.2% 的总古菌) 与次日的 11:19 (占比 9.3% 的总古菌) 两个时间点出现爆发现象, 甚至在 15:30 这一时间点取代了 OTU MG I-1 成为主导的 MG I 古菌类群。这表明 OTU MG I-2 可能充当着投机者的角色, 仅在 OTU MG I-1 受到抑制的时候, OTU MG I-2 才有机会在资源的竞争中取得优势地位。从构建的 MG I 系统发育树来看, OTU MG I-1 与 OTU MG I-2 同属于 *Nitrosopumilus*, 有较近的亲缘关

系(图 3)。与 OTU MG I-2 16S rRNA 序列最相似的 2 株纯培养 MG I 菌株 *Nitrosopumilus*-PS0 与 *Nitrosopumilus*-HCE1, 在前人的研究中被发现它们无法完全脱离外源有机质, 仅凭化能自养作用为自己提供生命活动所需的全部有机物<sup>[48]</sup>。若 MG I-2 与它们在碳代谢上有相似的生理机制, 那么 MG I-1 在日间的大量死亡释放出的有机质, 可能成为导致 MG I-2 勃发的重要因素。

#### 2.4 MG I 古菌、藻类与环境因子的关系

MG I 古菌与藻类在昼夜时间周期上的变化相较于 MG II 古菌和细菌的更为明显(图 1)。在次日凌晨 3:48 MG I 古菌达到最高浓度的同时, 藻类浓度最低(图 4A)。在 MG I 古菌的上

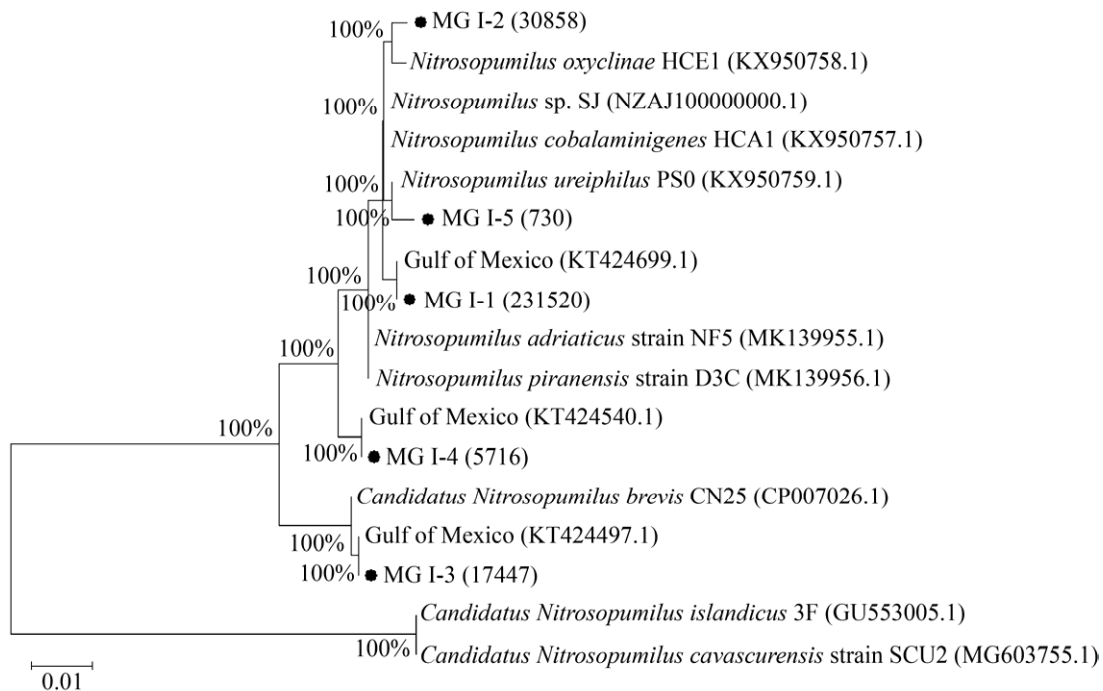


图 3 基于 MG I 古菌的 16S rRNA 基因的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of MG I archaea based on 16S rRNA gene. The tree is constructed with neighbor-joining method in MEGA-X software. ClustalW is used for the multiple sequencing alignment. Bootstrap analysis is performed with 1 000 replicates. Bootstrap values above 50% (out of 1 000 trials) are displayed next to the nodes. Labels inside the bracket presents the NCBI accession number or the reads number (clustered at 99% similarities). *Nitrosocaldus islandicus*-3F and *Nitrosocaldus cavascurensis*-SCU2 sequences are invited as outgroups.

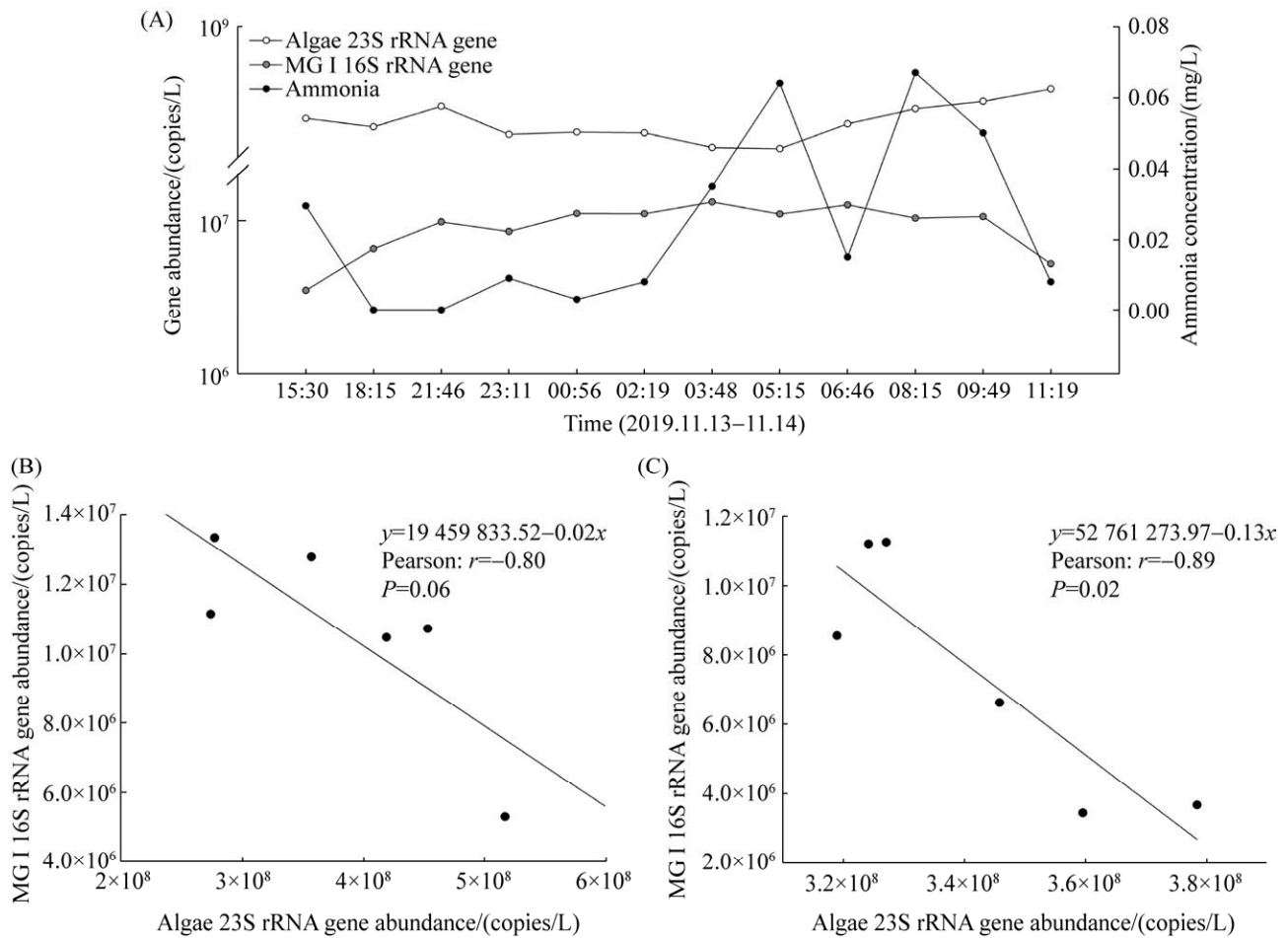


图 4 东澳岛海域 MG I 古菌 16S rRNA 基因丰度、藻类 23S rRNA 基因丰度和氨氮浓度的昼夜变化(A) 及相关性(B, C)

Figure 4 Time series of MG I archaea abundance, algae abundance and ammonia concentration (A) and their correlation (B: 15:30–2:19 periods as MG I archaea increasing, C: 3:48–11:19 periods as MG I archaea decreasing). The point at 21:46 is deleted as an outlier in this analysis as its MG I archaea and algae abundance data differ dramatically from its surrounding data.

升与下降阶段(以次日凌晨 3:48 为界,该时间点之前为 MG I 上升期,之后为下降期)都一定程度上呈现与藻类丰度的负相关(上升期:  $R = -0.8$ ,  $P = 0.06$ ; 下降期:  $R = -0.89$ ,  $P = 0.02$ ),但其斜率有一定的差异(图 4B、C)。MG I 古菌和藻类是海洋氨氮的主要利用者,前者利用氨氮进行化能自养过程,后者利用氨氮合成氨基酸。MG I 古菌与藻类可能存在一定的氨氮竞争关系,这样的竞争关系可能是影响 MG I 古菌和藻类浓

度变化的主要因素。海水中氨氮浓度在昼夜尺度周期内随着 MG I 古菌丰度发生了较大的变化。在 MG I 古菌增长周期内,氨氮浓度保持在较低的水平,而在 MG I 古菌衰亡周期内,氨氮浓度水平有了显著的提升(Mann-Whitney 差异性检测<sup>[49]</sup>,  $P < 0.05$ ),这从侧面表现出 MG I 古菌对氨氮的高亲和力, MG I 古菌对氨氮的氧化过程是海水体系中清除氨氮的主要机制。

5 个主要的 MG I 古菌 OTUs (占 MG I 古菌



99.9%的总序列数)均与不同的藻类 OTUs (占藻类 46.0%的总 OTU 数, 50.6%总藻量)表现出了一定的相关关系( $P<0.05$ )。其中 MG I-1 (占 86.4%的总 MG I 古菌量)、I-2 (占 4.7%的总 MG I 古菌量)、I-3 (占 6.7%的总 MG I 古菌量)、I-4 (占 1.9%的总 MG I 古菌量)与隐藻(4 OTUs, 16 组相关性)、硅藻(3 OTUs, 8 组相关性)、定鞭藻(3 OTUs, 10 组相关性)、绿藻(2 OTUs, 7 组相关性)和甲藻(2 OTUs, 7 组相关性) OTUs 表现出了显著的相关关系(共 52 组相关性)。其中, MG I-1、I-3、I-4 与藻类的关系主要表现为负相关, 而 MG I-2 则与藻类表现出正相关。MG I-5 (占 MG I 古菌 0.2%的总 MG I 古菌量)则与蓝藻(4 OTUs)、甲藻(2 OTUs)和硅藻(2 OTUs)类群表现出负相关关系(共 8 组相关性)。各环境参数中, 温度与 MG I-1、I-3、I-4 的关系表现为正

相关, 与 MG I-2 表现出负相关, 与 MG I-5 无明显关系。MG I-5 与盐度表现出了良好的正相关, 与硝酸盐表现出了负相关(图 5)。

5 条主要的 MG I 古菌 OTUs 大多来源于 *Nitrosopumilus* 属(MG I-1、I-2、I-4、I-5), MG I-3 来源于 *Nitrosopelagicus* 属, 绝大多数(MG I-1、I-3、I-4, 共占 95.1%的总 MG I 古菌量)表现出了与环境因子和藻类较为相似的规律, 可能受到温度及真核藻类的影响。但是, MG I-5 与原核蓝藻呈现负相关, 且与盐度和硝酸盐关系密切。MG I-2 与其他 MG I 古菌类群表现出了与多数藻类正相关的关系, 预示其可能拥有独特的生理特征<sup>[45]</sup>。总之, MG I 古菌在 OTU 层面呈现出和环境因子及藻类不同的关系, 探明具体变化原因需要进一步更为详尽的生理代谢研究。

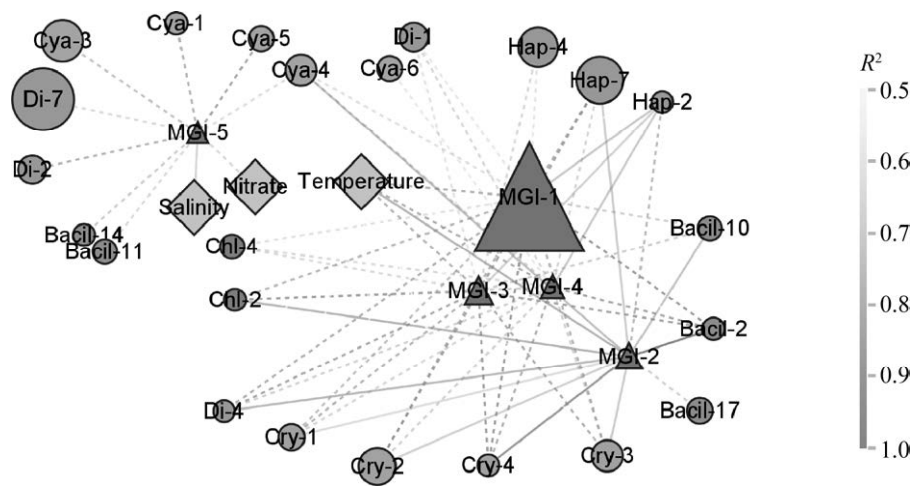


图 5 MG I 古菌、藻类与环境参数网络图

Figure 5 Network diagram of MG I archaea, algae and environmental parameters. This figure only presents the environmental parameters and algae OTUs which are significantly ( $P<0.05$ ) related to MG I archaea. The triangle represents MG I archaea OTU, the square represents the environmental parameter. The circle represents algae group (only the top 50 algae OTUs are used in the correlation analysis. Cya: *Cyanobacteria*; Bacil: *Bacillariophyta*; Chl: *Chlorophyta*; Cry: *Cryptophyta*; Hap: *Haptophyta*; Di: *Dinophyta*). The area of the triangles and circles means their relative OTU abundance. Solid line means positive correlation and the dotted line means negative correlation. Deeper color of the lines means higher  $R$  value.

### 3 结论与展望

#### 3.1 主要结论

珠江口东澳岛附近水体中海洋古菌 MG I 是丰度最高的古菌类群之一,其中 *Nitrosopumilus* 是最主要 MG I 古菌类群, *Nitrosopelagicus* 次之。MG I 古菌 OTU 均与藻类在昼夜周期内表现出了一定的相关关系。但是,同属于 *Nitrosopumilus* 的不同 MG I OTU 的丰度在昼夜周期中的表现有较大差异,可能是亚类不同代谢特征造成的。总体上,多数 MG I OTU 与藻类在丰度上呈现出显著负相关关系,仅少数 MG I OTU 表现出与藻类的正相关关系。因此,东澳岛水体中 MG I 古菌在昼夜周期内的变化关系可能受到藻类和温度等多种因素的影响。

#### 3.2 研究展望

不同的时间尺度上, MG I 古菌与藻类之间的关系可能不同。前人在不同环境的月际和日际研究中发现, MG I 古菌与藻类存在正相关关系,且藻类勃发的同时出现了 MG I 古菌的大量增长<sup>[1,50-53]</sup>。这与本文中所聚焦的短时间小时尺度下的负相关有所差异。在短时间周期(昼夜尺度)中, MG I 古菌与藻类之间可能在对有限的氨氮资源上发生竞争,并在温度和光照的影响下使得二者产生负相关关系。在长时间尺度上,氨氮等河流输入的营养盐含量以及日平均温度的提升或降低,或使得藻类与 MG I 古菌的丰度同步发生改变。同时,高丰度的藻类本身会将部分硝酸盐转换成氨氮且死亡降解的同时释放大量的氨氮及有机质<sup>[3,54-55]</sup>,都能够为 MG I 古菌所利用,导致长时间尺度上 MG I 与藻类可能发生正相关关系。然而,目前藻类与 MG I 之间关系的研究还比较有限,两者在不同时间尺度和环境下的变化还有待更细致的调查,且相关研究多基于观测数据,仍需要更多的实验室培养进行验证。

#### 致谢

感谢南方科技大学王浩老师团队对无人机系统制造作出的贡献。

#### 参考文献

- [1] Xie W, Luo HW, Murugapiran SK, Dodsworth JA, Chen SZ, Sun Y, Hedlund BP, Wang P, Fang HY, Deng MH, Zhang CL. Localized high abundance of marine group II archaea in the subtropical Pearl River Estuary: implications for their niche adaptation. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(2): 734-754.
- [2] Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437(7058): 543-546.
- [3] Perez-Garcia O, Escalante FME, De-Bashan LE, Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, 2011, 45(1): 11-36.
- [4] Podevin M, De Francisci D, Holdt SL, Angelidaki I. Effect of nitrogen source and acclimatization on specific growth rates of microalgae determined by a high-throughput *in vivo* microplate autofluorescence method. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(4): 1415-1423.
- [5] Kirchman DL. The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria. *Microbial Ecology*, 1994, 28(2): 255-271.
- [6] Martens-Habbena W, Berube PM, Urakawa H, De La Torre JR, Stahl DA. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying archaea and bacteria. *Nature*, 2009, 461(7266): 976-979.
- [7] Eppley RW, Thomas WH. Comparison of half-saturation constants for growth and nitrate uptake of marine phytoplankton 2. *Journal of Phycology*, 1969, 5(4): 375-379.
- [8] Wuchter C, Abbas B, Coolen M J L, et al. Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(33): 12317-22.
- [9] Liu Q, Tolar BB, Ross MJ, Cheek JB, Sweeney CM, Wallsgrove NJ, Popp BN, Hollibaugh JT. Light and temperature control the seasonal distribution of thaumarchaeota in the South Atlantic bight. *The ISME Journal*, 2018, 12(6): 1473-1485.
- [10] Murray AE, Preston CM, Massana R, Taylor LT, Blakis A, Wu K, DeLong EF. Seasonal and spatial variability

- of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(7): 2585–2595.
- [11] Mincer TJ, Church MJ, Taylor LT, Preston C, Karl DM, DeLong EF. Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(5): 1162–1175.
- [12] Kim JG, Gazi KS, Awala SI, Jung MY, Rhee SK. Ammonia-oxidizing archaea in biological interactions. *Journal of Microbiology*, 2021, 59(3): 298–310.
- [13] 林凤翱, 关春江, 卢兴旺. 近年来全国赤潮监控工作的成效以及存在问题与建议. *海洋环境科学*, 2010, 29(1): 148–151.  
Lin Fengao, Guan Chunjiang, Lu Xingwang. Effects of red tide events monitoring, existence questions and suggestions in coastal areas in recent years in China. *Marine Environmental Science*, 2010, 29(1): 148–151. (in Chinese)
- [14] 林洪瑛, 刘胜, 韩舞鹰. 珠江口底层海水季节性缺氧现象及其引发 CTB 的潜在威胁. 广东海洋学会会员代表大会暨学术研讨会, 2000.
- [15] Copley J. All at sea. *Nature*, 2002, 415(6872): 572–574.
- [16] Worden AZ, Follows MJ, Giovannoni SJ, Wilken S, Zimmerman AE, Keeling PJ. Environmental science. Rethinking the marine carbon cycle: factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science*, 2015, 347(6223): 1257–1264.
- [17] HJ 536-2009, 水质 氨氮的测定 水杨酸分光光度法.
- [18] GB 17378.4-2007, 海洋监测规范 第4部分: 海水分析.
- [19] Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB. 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(41): 14683–14688.
- [20] Presting GG. Identification of conserved regions in the plastid genome: implications for DNA barcoding and biological function. *Canadian Journal of Botany*, 2006, 84(9): 1434–1443.
- [21] Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 89(6): 670–679.
- [22] Yu Y, Lee C, Hwang S. Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. *Water Science and Technology*, 2005, 52(1/2): 85–91.
- [23] Massana R, Murray AE, Preston CM, DeLong EF. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic archaea in the Santa Barbara Channel. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(1): 50–56.
- [24] Teira E, Reinthaler T, Pernthaler A, Pernthaler J, Herndl GJ. Combining catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by bacteria and archaea in the deep ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(7): 4411–4414.
- [25] Zhang M, Chai L, Huang M, et al. Deciphering the archaeal communities in tree rhizosphere of the Qinghai-Tibetan plateau. *BMC microbiology*, 2020, 20(1): 235.
- [26] Yoon TH, Kang HE, Kang CK, Lee SH, Ahn DH, Park H, Kim HW. Development of a cost-effective metabarcoding strategy for analysis of the marine phytoplankton community. *PeerJ*, 2016, 4: e2115.
- [27] Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvall C, Edwards CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo JR, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang LJ, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciolk T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Priesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, Van Der Hoof JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, Von Hippel M, Walters W, Wan YH, Wang MX, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang YL, Zhu QY, Knight R, Caporaso JG. Reproducible, interactive, scalable and

- extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(8): 852–857.
- [28] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 2016, 13(7): 581–583.
- [29] Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 2016, 4: e2584.
- [30] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590–D596.
- [31] Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36((S2): W5–W9.
- [32] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547–1549.
- [33] IBM-Corp. IBM SPSS statistics for windows. *New York*, 2011.
- [34] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin ND, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 2003, 13(11): 2498–2504.
- [35] 陈晨, 杨桂朋, 高先池, 于娟, 吴冠伟. 胶州湾微表层和次表层海水中营养盐的分布特征及富营养化研究. *环境科学学报*, 2012, 32(8): 1856–1865.  
Chen C, Yang GP, Gao XC, Yü J, Wu GW. Nutrients distributional characteristics and eutrophication in the sea-surface microlayer and subsurface water in the Jiaozhou Bay. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2012, 32(8): 1856–1865. (in Chinese)
- [36] Church MJ, Wai B, Karl DM, DeLong EF. Abundances of crenarchaeal *AmoA* genes and transcripts in the Pacific Ocean. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(3): 679–688.
- [37] Merbt SN, Stahl DA, Casamayor EO, Martí E, Nicol GW, Prosser JI. Differential photoinhibition of bacterial and archaeal ammonia oxidation. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 327(1): 41–46.
- [38] Qin W, Amin SA, Martens-Habbena W, Walker CB, Urakawa H, Devol AH, Ingalls AE, Moffett JW, Armbrust EV, Stahl DA. Marine ammonia-oxidizing archaeal isolates display obligate mixotrophy and wide ecotypic variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(34): 12504–12509.
- [39] Hou L, Xie XB, Wan XH, Kao SJ, Jiao NZ, Zhang Y. Niche differentiation of ammonia and nitrite oxidizers along a salinity gradient from the Pearl River estuary to the South China Sea. *Biogeosciences*, 2018, 15(16): 5169–5187.
- [40] Lehman PW, Kurobe T, Huynh K, Lesmeister S, Teh SJ. Covariance of phytoplankton, bacteria, and zooplankton communities within *Microcystis* blooms in San Francisco estuary. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 632264.
- [41] 位光山. 黄河入海口沉积物和水体中微生物群落的比较研究. 山东农业大学硕士学位论文, 2015.
- [42] 朱尚清, 刘吉文, 郑艳芬, 刘骥, 孟哲, 刘晓月, 王雅文, 张晓华. 中国近海区域古菌群落结构研究概述. *海洋科学*, 2019, 43(5): 123–134.  
Zhu SQ, Liu JW, Zheng YF, Liu J, Meng Z, Liu XY, Wang YW, Zhang XH. An overview of archaeal community structure in the Chinese coastal areas. *Marine Sciences*, 2019, 43(5): 123–134. (in Chinese)
- [43] Chen Y, Mi TZ, Liu YT, Li SQ, Zhen Y. Microbial community composition and function in sediments from the Pearl River mouth basin. *Journal of Ocean University of China*, 2020, 19(4): 941–953.
- [44] Huber H, Hohn MJ, Rachel R, Fuchs T, Wimmer VC, Stetter KO. A new phylum of archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, 2002, 417(6884): 63–67.
- [45] Xie W, Zhang CL, Zhou XD, Wang P. Salinity-dominated change in community structure and ecological function of archaea from the lower Pearl River to coastal South China Sea. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(18): 7971–7982.
- [46] Wang HL, Bier R, Zgleszewski L, Peipoch M, Omondi E, Mukherjee A, Chen F, Zhang CL, Kan JJ. Distinct distribution of archaea from soil to freshwater to estuary: implications of archaeal composition and function in different environments. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 576661.
- [47] Santoro AE, Richter RA, Dupont CL. Planktonic marine archaea. *Annual Review of Marine Science*, 2019, 11(1): 131–158.
- [48] Qin W, Heal KR, Ramdasi R, Kobelt JN, Martens-Habbena W, Bertagnolli AD, Amin SA, Walker CB, Urakawa H, Könneke M, Devol AH,

- Moffett JW, Armbrust EV, Jensen GJ, Ingalls AE, Stahl DA. *Nitrosopumilus maritimus* gen. nov., sp. nov., *Nitrosopumilus cobalaminigenes* sp. nov., *Nitrosopumilus oxyclinae* sp. nov., and *Nitrosopumilus ureiphilus* sp. nov., four marine ammonia-oxidizing archaea of the phylum Thaumarchaeota. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(12): 5067–5079.
- [49] Mann HB, Whitney DR. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 1947, 18(1): 50–60.
- [50] Doxey AC, Kurtz DA, Lynch MD, Sauder, LA, Neufeld, JD. Aquatic metagenomes implicate Thaumarchaeota in global cobalamin production. *The ISME Journal*, 2015, 9(2): 461–471.
- [51] Robidart JC, Preston CM, Paerl RW, Turk, KA, Mosier, AC, Francis, CA, Scholin, CA, Zehr, JP. Seasonal *Synechococcus* and *Thaumarchaeal* population dynamics examined with high resolution with remote *in situ* instrumentation. *The ISME Journal*, 2012, 6(3): 513–523.
- [52] Tolar BB, King GM, Hollibaugh JT. An analysis of *Thaumarchaeota* populations from the northern gulf of Mexico. *Front Microbiol*, 2013, 4: 72.
- [53] Wells LE, Cordray M, Bowerman S, Miller LA, Vincent WF, Deming JW. Archaea in particle-rich waters of the Beaufort Shelf and Franklin Bay, Canadian Arctic: clues to an allochthonous origin? *Limnology & Oceanography*, 2006, 51(1): 47–59.
- [54] Fernandez E, Galvan A. Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(9): 2279–2287.
- [55] Jiang X, Gao G, Zhang L, Tang, Xiangming Shao KQ, Hu Y, Cai J. Role of algal accumulations on the partitioning between N<sub>2</sub> production and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in eutrophic lakes. *Water Research*, 2020, 183: 116075.



**张传伦**，博士，南方科技大学教授。主要研究方向为微生物(特别是古菌)在环境及能源、地质历史演化及全球变化中的作用；擅长整合脂类标记物、稳定同位素和分子DNA等交叉手段来研究微生物在全球碳氮循环中的作用；研究课题主要包括深部生物圈，热泉及其他极端环境地质微生物，天然气水合物生物地球化学，海洋和陆相古菌的生物地球化学过程及气候和环境变化指标的开发及应用。率先在墨西哥湾冷泉和甲烷水合物古菌脂类生物地球化学、热泉古菌脂类生物地球化学、南海古菌脂类生物地球化学以及海洋古菌生命演化等方面开展相关研究工作，并取得了一系列创新成果发表在国际学术期刊；多次在美国地球物理年会(American Geophysical Union)组织并主持专题会议。