

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620141152460

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

红树林湿地亚硝酸盐型厌氧氨氧化和厌氧
甲烷氧化微生物时空分布

Spatial and temporal distribution of nitrite-
dependent anaerobic ammonium and
methane oxidation bacteria in mangrove
wetland

张满平

指导教师姓名: 田 蕴 教 授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2017 年 04 月

论文答辩日期: 2017 年 05 月

学位授予日期: 2017 年 06 月

答辩委员会主席: 周宁一

评 阅 人: 周宁一 张晓昱

2017年06月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其它个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（田蕴教授）课题（组）的研究成果，获得（田蕴教授）课题（组）经费或实验室的资助，在（田蕴教授）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：张满平

2017年05月21日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：张满平

2017年05月21日

摘要	i
Abstract	v
第一章 前言	1
1 红树林湿地生态系统碳氮循环及其生态学意义	1
1.1 红树林湿地生态系统.....	1
1.2 红树林湿地沉积物不同界面碳氮循环主要过程以及生态价值.....	3
2 ANAMMOX 与 N-DAMO 微生物以及潜在生态学意义	4
2.1 ANAMMOX 和 N-DAMO 微生物的发现.....	4
2.2 ANAMMOX 和 N-DAMO 微生物结构以及反应机理.....	5
2.3 ANAMMOX 和 N-DAMO 微生物研究进展及生态学意义.....	8
3 研究目的及意义	9
第二章 材料与方法	12
1 材料	12
1.1 研究区域与采样站位选择.....	12
1.2 菌株与质粒.....	14
1.3 主要试剂药品.....	14
1.4 PCR 引物.....	14
1.5 主要培养基.....	17
1.6 分析软件.....	17
1.7 主要仪器.....	18
2 基本方法	19
2.1 红树林沉积物理化参数测定.....	19
2.2 稳定同位素示踪试验.....	20
2.3 ANAMMOX 和 N-DAMO 微生物多样性分析.....	21
2.4 ANAMMOX 菌和 N-DAMO 菌丰度测定.....	23
2.5 生物统计学分析.....	26

第三章 结果与分析	27
1 不同季节红树林湿地沉积物理化参数	27
1.1 pH.....	27
1.2 温度.....	27
1.3 氧化还原电位.....	28
1.4 含水率.....	29
1.5 盐度.....	30
1.6 甲烷浓度.....	31
1.7 铵盐浓度.....	32
1.8 亚硝酸盐浓度.....	33
1.9 硝酸盐浓度.....	34
1.10 总氮含量.....	35
1.11 总有机碳含量.....	35
1.12 总硫含量.....	36
2 红树林湿地不同深度沉积物中 ANAMMOX 和 N-DAMO 菌群落组成以及多样性	37
2.1 红树林湿地沉积物 ANAMMOX 菌群落组成以及多样性.....	37
2.2 红树林湿地沉积物 N-DAMO 菌群落组成以及多样性.....	51
3 红树林湿地不同深度沉积物中 ANAMMOX 和 N-DAMO 丰度特征	65
3.1 红树林湿地沉积物 ANAMMOX 菌数量.....	65
3.2 红树林湿地沉积物 N-DAMO 菌数量.....	67
4 不同季节红树林湿地沉积物 ANAMMOX 和 N-DAMO 活性及其生态效应	69
4.1 红树林湿地沉积物 ANAMMOX 和 N-DAMO 菌活性.....	69
4.2 红树林湿地沉积物 ANAMMOX 和 N-DAMO 菌所致氮气通量和甲烷氧化量	72
4.3 红树林湿地沉积物 ANAMMOX 和 N-DAMO 菌生态效应.....	77
5 红树林湿地沉积物理化参数与 ANAMMOX 和 N-DAMO 菌相关性研究	77

第四章 讨论	79
1 红树林湿地沉积物 ANAMMOX 和 N-DAMO 群落组成及多样性	79
2 红树林湿地沉积物 ANAMMOX 和 N-DAMO 菌数量分析	81
3 红树林湿地沉积物 ANAMMOX 和 N-DAMO 菌活性分析	82
4 红树林湿地沉积物理化参数对 ANAMMOX 和 N-DAMO 影响	84
第五章 结论与展望	86
1 主要结论	86
2 创新点	89
3 不足与展望	89
参考文献	91
附录.....	109
附录一 硕士研究生期间参与课题	109
附录二 硕士研究生期间已发表及待发表文章	109
附录三 硕士研究生期间参加学术会议	109
附录四 红树林沉积物理化参数与 ANAMMOX 和 N-DAMO 菌分析	110
致谢.....	126

Contents

Abstract (in Chinese)	i
Abstract (in English)	v
Chapter 1 Introduction	1
1 Carbon and nitrogen cycles of mangrove wetland ecosystem and its ecological significance	1
1.1 Mangrove wetland ecosystem.....	1
1.2 The main process of carbon and nitrogen cycles in different interfaces of mangrove wetland and its ecological value	3
2 The potential ecological significance of ANAMMOX and N-DAMO microbes	4
2.1 The discovery of ANAMMOX and N-DAMO microbes	4
2.2 The structure and reaction mechanism of ANAMMOX and N-DAMO microbes.....	5
2.3 The research progress and ecological significance of ANAMMOX and N-DAMO microbes	8
3 Research purpose and meaning	9
Chapter 2 Materials and methods	12
1 Materials	12
1.1 Study area and sampling station	12
1.2 Strains and plasmids	14
1.3 Main reagents and drugs	14
1.4 PCR primers.....	14
1.5 Main mediums	17
1.6 Analysis software	17
1.7 Key equipments	18
2 Basic methods	19
2.1 Detection of physicochemical parameters in mangrove sediments	19

2.2 Stable isotope tracer experiment.....	20
2.3 Diversity analysis of ANAMMOX and N-DAMO bacteria	21
2.4 Determination of the abundance of ANAMMOX and N-DAMO bacteria	23
2.5 Biostatistical analysis.....	26
Chapter 3 Results and analysis.....	27
1 Physicochemical parameters in different seasons of mangrove sediments.	27
1.1 pH.....	27
1.2 Temperature	27
1.3 The potential redox	28
1.4 Water content	29
1.5 Salinity	30
1.6 Methane concentration.....	31
1.7 Ammonium concentration.....	32
1.8 Nitrite concentration	33
1.9 Nitrate concentration.....	34
1.10 Total nitrogen concentration	35
1.11 Total organic carbon concentration	35
1.12 Total sulfur concentration	36
2 The community structure and diversity of ANAMMOX and N-DAMO bacteria in different depths of mangrove sediments.....	37
2.1 The community structure and diversity of ANAMMOX bacteria in mangrove sediments	37
2.2 The community structure and diversity of N-DAMO bacteria in mangrove sediments	51
3 Abundance of ANAMMOX and N-DAMO bacteria in different depths of mangrove sediments.....	65
3.1 Abundance of ANAMMOX bacteria in mangrove sediments.....	65
3.2 Abundance of N-DAMO bacteria in mangrove sediments.....	67

4 Rates and ecological benefits of ANAMMOX and N-DAMO bacteria in different seasons of mangrove sediments.....	69
4.1 The potential rates of ANAMMOX and N-DAMO bacteria in mangrove sediments	69
4.2 Flux of nitrogen and methane oxidation by ANAMMOX and N-DAMO bacteria in mangrove sediments	72
4.3 Ecological benefits of ANAMMOX and N-DAMO bacteria in mangrove sediments.....	77
5 Study on physicochemical parameters and ANAMMOX and N-DAMO bacteria in mangrove sediments	77
Chapter 4 Discussion	79
1 The community structure and diversity of ANAMMOX and N-DAMO bacteria in mangrove sediments	79
2 Quantitative analysis of ANAMMOX and N-DAMO bacteria in mangrove sediments.....	81
3 Rates analysis of ANAMMOX and N-DAMO bacteria in mangrove sediments.....	82
4 Effects of sediment physicochemical parameters on ANAMMOX and N-DAMO bacteria in mangrove wetland.....	84
Chapter 5 Conclusions and prospect	86
1 Main conclusions.....	86
2 Innovations	89
3 Deficiency and prospect.....	89
References	91
Appendix.....	109
Appendix 1 Participation projects during postgraduate.....	109
Appendix 2 Articles published during postgraduate.....	109
Appendix 3 Attending academic conferences during postgraduate.....	109

Appendix 4 Analysis of sediment physicochemical parameters and ANAMMOX and N-DAMO bacteria in mangrove wetland	110
Acknowledgement	126

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

厌氧氨氧化 (anaerobic ammonium oxidation, ANAMMOX) 和反硝化型厌氧甲烷氧化 (nitrite-dependent anaerobic methane oxidation, N-DAMO) 反应是新发现的两类能够参与碳氮循环的微生物, 它们的发现对完善全球碳氮循环理论具有重要意义。红树林湿地生态系统位于陆地和海洋交界处, 周期性受海水浸淹, 并且能够接受来自海洋和陆地的各种污染物, 因此物质资源和生物资源都很丰富。同时, 红树林湿地沉积物能够为 ANAMMOX 和 N-DAMO 微生物创造一个厌氧环境, 有利于二者生存。目前, 关于 ANAMMOX 菌的研究主要集中在海洋环境, 而 N-DAMO 菌的研究主要集中在淡水湿地, 对于二者在红树林湿地沉积物中的相互作用鲜有报道。本研究以红树林湿地不同深度沉积物为研究对象, 对其中 ANAMMOX 和 N-DAMO 微生物的群落结构以及多样性、数量分布、反应活性和生态效益进行系统地研究, 主要研究结果如下:

1. 探明红树林湿地沉积物 ANAMMOX 和 N-DAMO 菌群落结构以及多样性

夏季和冬季从红树林湿地沉积物中得到的 ANAMMOX 菌 16S rRNA 基因序列都隶属于 *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Kuenenia* 和 *Candidatus Scalindua* 属。其中, *Candidatus Kuenenia* 和 *Candidatus Scalindua* 属是红树林湿地沉积物中的优势 ANAMMOX 菌。同时, 冬季从红树林湿地沉积物中得到的 ANAMMOX 菌 *hzsB* 基因序列隶属于 *Candidatus Kuenenia* 和 *Candidatus Scalindua* 属。研究发现, 桐花树、秋茄和白骨壤生境表层 (0-20 cm) ANAMMOX 菌群落结构比较相似, 中间层 (20-40 cm 和 40-60 cm) ANAMMOX 菌群落结构比较相似, 以及底层 (60-80 cm 和 80-100 cm) ANAMMOX 菌群落结构比较相似。并且, 红树林湿地沉积物中 ANAMMOX 菌群落结构与海湾中 ANAMMOX 菌群落结构最为相似。其次, 与根际土壤和太湖中 ANAMMOX 菌群落结构也有类似之处。相关性分析表明, 沉积物总有机碳含量、含水率、氧化还原电位以及硝酸盐浓度对红树林湿地沉积物中 ANAMMOX 菌群落结构影响较大。

夏季从红树林湿地沉积物中得到的 N-DAMO 菌 16S rRNA 基因序列隶属于 groupB, D, E, 而冬季从红树林湿地沉积物中得到的 N-DAMO 菌 16S rRNA 基因序列隶属于 groupA, B, D。其中, groupB 是红树林湿地沉积物中的优势 N-DAMO 菌。同时, 夏季和冬季从红树林湿地沉积物中得到的 N-DAMO 菌 *pmoA* 基因序

列都归属于 *M.oxyfera* 和 *M.sinica* 属。研究发现, 桐花树、秋茄和白骨壤生境表层 (0-20 cm) N-DAMO 菌群落结构比较相似, 中间层 (20-40 cm 和 40-60 cm) N-DAMO 菌群落结构比较相似, 以及底层 (60-80 cm 和 80-100 cm) N-DAMO 菌群落结构比较相似。并且, 红树林湿地沉积物中 N-DAMO 菌群落结构与海洋和香港红树林湿地中 N-DAMO 菌群落结构最为相似。其次, 与自然淡水湿地沉积物中 N-DAMO 菌群落结构也有类似之处。相关性分析表明, 沉积物总有机碳含量、含水率、亚硝酸盐浓度、甲烷浓度以及氧化还原电位是影响红树林湿地沉积物中 N-DAMO 菌群落结构的主要环境因子。

2. 探明红树林湿地沉积物 ANAMMOX 和 N-DAMO 菌数量分布

红树林湿地沉积物中存在相当数量的 ANAMMOX 菌。其中, 夏季和冬季红树林湿地沉积物中 ANAMMOX 菌 16S rRNA 基因数量变化范围分别为 0.41×10^7 - 4.07×10^7 拷贝 g^{-1} (干土)和 1.39×10^7 - 9.74×10^7 拷贝 g^{-1} (干土); 冬季红树林湿地沉积物中 *hzsB* 基因数量变化范围为 0.42×10^6 - 6.44×10^6 拷贝 g^{-1} (干土)。在红树林湿地系统中, 表层沉积物 ANAMMOX 菌数量明显高于深层沉积物中 ANAMMOX 菌数量, 表明红树林湿地表层沉积物是 ANAMMOX 菌的主要分布区域。

红树林湿地沉积物中分布有大量的 N-DAMO 菌。其中, 夏季和冬季红树林湿地沉积物中 N-DAMO 菌 16S rRNA 基因数量变化范围分别为 0.24×10^7 - 2.09×10^7 拷贝 g^{-1} (干土)和 0.16×10^4 - 5.20×10^4 拷贝 g^{-1} (干土); 夏季和冬季红树林湿地沉积物中 N-DAMO 菌 *pmoA* 基因数量变化范围分别为 0.21×10^7 - 3.38×10^7 拷贝 g^{-1} (干土)和 0.59×10^6 - 2.72×10^6 拷贝 g^{-1} (干土)。在红树林湿地系统中, 表层沉积物 N-DAMO 菌数量明显高于深层沉积物中 N-DAMO 菌数量, 表明红树林湿地表层沉积物是 N-DAMO 菌的主要分布区域。

3. 探明红树林湿地沉积物 ANAMMOX 和 N-DAMO 菌反应活性

红树林湿地沉积物中存在大规模的 ANAMMOX 反应, 反应活性为 4.83 - $277.36 \text{ nmolN}_2 \cdot g^{-1}(\text{干重}) \cdot d^{-1}$ 。并且桐花树生境 ANAMMOX 菌活性随着沉积物深度的增加呈现出先下降后上升的趋势, 而秋茄和白骨壤生境 ANAMMOX 菌活性随着沉积物深度的增加逐渐增大。同时, 桐花树生境 ANAMMOX 菌活性普遍低于秋茄和白骨壤生境。从而表明, 红树林湿地深层沉积物是 ANAMMOX 菌反应热点地区。

红树林湿地沉积物中同样存在大规模的 N-DAMO 反应，反应活性为 $24.19-1077.44 \text{ nmolCO}_2 \cdot \text{g}^{-1}(\text{干重}) \cdot \text{d}^{-1}$ ，并且桐花树生境 N-DAMO 菌活性随着沉积物深度的增加呈现出先上升后下降的趋势，而秋茄和白骨壤生境 N-DAMO 菌活性随着沉积物深度的增加逐渐下降。同时，桐花树生境 N-DAMO 菌活性普遍高于秋茄和白骨壤生境。从而表明，红树林湿地表层沉积物是 N-DAMO 菌反应热点地区。

4. 探明红树林湿地沉积物理化参数对 ANAMMOX 和 N-DAMO 菌影响

皮尔逊相关性分析发现，红树林湿地沉积物氧化还原电位、亚硝酸盐浓度、总有机碳浓度等与 ANAMMOX 菌多样性呈正相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；沉积物 pH 和温度与 ANAMMOX 菌多样性呈负相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。红树林湿地沉积物含水率、亚硝酸盐浓度、总有机碳浓度等与 ANAMMOX 菌数量呈正相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，pH 和温度与 ANAMMOX 菌数量呈负相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。沉积物总氮和总有机碳浓度与 ANAMMOX 菌活性呈负相关 ($P < 0.05$)。

皮尔逊相关性分析发现，红树林湿地沉积物氧化还原电位、含水率、甲烷浓度等与 N-DAMO 菌多样性呈正相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；沉积物 pH、温度和铵盐浓度与 N-DAMO 菌多样性呈负相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。同时，沉积物氧化还原电位、温度和铵盐浓度与 N-DAMO 菌数量呈正相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，盐度和甲烷浓度与 N-DAMO 菌数量呈负相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。而且，沉积物含水率、亚硝酸盐浓度、总有机碳浓度等与 N-DAMO 菌活性呈正相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，pH 与 N-DAMO 菌活性呈负相关 ($P < 0.01$)。

5. 探明红树林湿地沉积物 ANAMMOX 和 N-DAMO 菌生态环境效应

本研究证实，ANAMMOX 和 N-DAMO 微生物能够共存于红树林湿地生态系统。同时，稳定同位素示踪试验结果表明，ANAMMOX 菌的反应热点在沉积物底层，而 N-DAMO 菌的反应热点在沉积物表层。因此，红树林湿地沉积物中 ANAMMOX 和 N-DAMO 菌的生态位是相互分异的关系。

由稳定同位素示踪试验以及通量计算发现，红树林湿地沉积物中 ANAMMOX 菌能够去除湿地系统平均外源氮负荷的 5.4%，是湿地系统中重要的无机氮汇，可大大缓解河流、湖泊以及海洋等水体的富营养化进程。据估计，红

树林湿地沉积物中 N-DAMO 反应能够去除湿地系统平均外源氮负荷的 36.2%，其在缓解水体富营养化进程中起着至关重要的作用。此外，红树林湿地沉积物中 N-DAMO 反应可氧化湿地系统中产生的 2%-6% 的甲烷气体，是湿地系统被忽视的重要的温室气体甲烷的汇。

关键词：红树林湿地；厌氧氨氧化；厌氧甲烷氧化；多样性；群落结构；数量分布；潜在活性；生态效益；生态位

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Nitrite-dependent anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) and anaerobic methane oxidation (N-DAMO), two recently discovered processes in microbial nitrogen and carbon cycles, which are significant to accomplish the global nitrogen and carbon cycles, are unique in linking the two important biogeochemical cycles. Mangrove wetlands located in the land/ocean interface are periodically flooded by seawater, which can create an anaerobic environment in the sediment, and the anoxic conditions of the sediments can provide suitable habitats for ANAMMOX and N-DAMO bacteria. And mangrove wetland can accept all kinds of pollutants from sea and land, so the material resources and biological resources are very rich. At present, the research of the ANAMMOX bacteria mainly focuses on marine environment, but the study about N-DAMO process mainly concentrates on freshwater habitats. However, the interaction between the two different microorganisms in mangrove sediments are rarely reported and the niche and activity of ANAMMOX and N-DAMO bacteria in the mangrove ecosystem have not been confirmed. Here, we report the community structures, diversity, abundance, activities and ecological benefits of ANAMMOX and N-DAMO bacteria in different layers of mangrove sediments. The major results are as follows:

1. The community structures and diversity of ANAMMOX and N-DAMO bacteria in mangrove sediments

Different genera of ANAMMOX bacteria were detected in mangrove sediments in summer and winter, indicating a high diversity of ANAMMOX bacteria, which affiliated to *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Kuenenia* and *Candidatus Scalindua* based on ANAMMOX bacterial 16S rRNA gene. *Candidatus Kuenenia* and *Candidatus Scalindua* were the dominant ANAMMOX bacteria in mangrove sediments. In the meantime, the genera collected from mangrove sediments of *hzsB* gene in winter affiliated to *Candidatus Kuenenia* and *Candidatus Scalindua*. It was found that the community structures of ANAMMOX bacteria in upper layers (0-20 cm), middle layers (20-40 cm and 40-60 cm) and deeper layers (60-80 cm and 80-100 cm) of *Aegiceras*

corniculatum (AC), *Rhizophora candel* (RC) and *Avicennia marina* (AM) habitats were extremely similar, respectively. At the same time, the community structures of ANAMMOX bacteria in mangrove sediments were most similar with that in bay environment and it had some similarity with that in rhizosphere soil and Taihu sediments. Correlation analysis showed that the sediment total organic carbon concentration, water content, the redox potential and nitrate concentration were the most significant factors affecting the community structures of ANAMMOX bacteria in mangrove sediments.

Different clusters of N-DAMO bacteria were found in mangrove sediments in summer and winter, suggesting a high diversity of N-DAMO bacteria, which belonged to group B, D, E in summer and group A, B, D in winter based on N-DAMO bacterial 16S rRNA gene. Group B was the dominant N-DAMO bacteria in mangrove sediments. Meanwhile, the genera obtained from mangrove sediments of *pmoA* gene in summer and winter belonged to *M.oxyfera* and *M.sinica*. The research discovered that the community structures of N-DAMO bacteria in upper layers (0-20 cm), middle layers (20-40 cm and 40-60 cm) and deeper layers (60-80 cm and 80-100 cm) of *Aegiceras corniculatum* (AC), *Rhizophora candel* (RC) and *Avicennia marina* (AM) habitats were extremely similar, respectively. In the meanwhile, the community structures of N-DAMO bacteria in mangrove sediments were most similar with that in marine and Mai Po wetland and it had some similarity with that in natural freshwater wetland soil. Correlation analysis indicated that the sediment total organic carbon concentration, water content, nitrite concentration, methane concentration and the redox potential were the most significant factors influencing the community structures of N-DAMO bacteria in mangrove sediments.

2. The abundance of ANAMMOX and N-DAMO bacteria in mangrove sediments

Large numbers of ANAMMOX bacteria were detected in mangrove sediments. The abundance of ANAMMOX bacterial 16S rRNA gene ranged from 0.41×10^7 to 4.07×10^7 and 1.39×10^7 to 9.74×10^7 copies per gram of dry soil in the examined sediment cores in summer and winter. And the abundance of *hzsB* gene ranged from 0.42×10^6 to 6.44×10^6 copies per gram of dry soil in the examined sediment cores in

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库