

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2015.06.001

## 基于高通量测序分析的大鹏澳海域沉积物古菌群落结构初步研究

李旭光<sup>1,2</sup>, 齐占会<sup>1</sup>, 林琳<sup>1</sup>, 张喆<sup>1</sup>, 黄洪辉<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东省渔业生态环境重点实验室, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东广州 510300; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 于2014年夏季(8月)利用柱状采泥器采集了大亚湾大鹏澳海域养殖区、对照区5 cm层和30 cm层沉积物样品, 并通过高通量测序方法对沉积物样品古细菌生物群落结构进行了分析。结果显示, 大鹏澳沉积物深层样品中古菌占原核生物的比例高于表层。5 cm层和30 cm层沉积物古菌群落优势种存在明显差异, 分别为广古菌门(Euryarchaeota)的热原体纲(Thermoplasmata)和泉古菌门(Crenarchaeota)的MCG纲(Miscellaneous Crenarchaeotic Group)。总体上, 泉古菌门相对丰度高于广古菌门。养殖区古菌优势种的数量显著高于非养殖区。养殖区表层和深层沉积物之间古菌群落物种组成和数量的差异明显大于非养殖区。古菌群落的空间差异一定程度上反映了大鹏澳沉积物古菌群落受到了养殖活动的影响, 但影响的机制还需要深入研究。

**关键词:** 沉积物; 古菌群落; 16S rRNA; 高通量测序; 近海养殖

中图分类号: Q 938.1<sup>+</sup>5

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2015)06-0001-08

## Preliminary study on archaeal community in sediment of Dapeng Cove using high-throughput sequencing

LI Xuguang<sup>1,2</sup>, QI Zhanhui<sup>1</sup>, LIN Lin<sup>1</sup>, ZHANG Zhe<sup>1</sup>, HUANG Honghui<sup>1</sup>

(1. Guangdong Provincial Key Lab. of Fishery Ecology and Environment; Key Lab. of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** We analyzed the archaeal community in tropical aquaculture farm sediments in Dapeng Cove, located in the southwest of Daya Bay, southern China. Sediment cores samples (5 cm and 30 cm in depth) were collected by a core-sampler in summer (August, 2014). Results show that the abundance of archaea in deep layers was higher than that in surface layer. The dominant species in surface and deep layers were Class Thermoplasma, Phylum Euryarchaeota, and Class MCG (Miscellaneous Crenarchaeotic Group), Phylum Crenarchaeota. In general, the abundance of Crenarchaeota was higher than that of Euryarchaeota. The abundance of predominant species was higher in aquaculture farms than in non-aquaculture area. The difference in archaeal community structure between surface and deep layers was more significant in aquaculture farms than that in non-aquaculture area. Results indicate that the archaeal community structure might be affected by intensive aquaculture activities, whose underlying mechanism needs further study.

**Key words:** sediment; archaeal community; 16S rRNA; high-throughput sequencing; nearshore aquaculture

收稿日期: 2015-01-26; 修回日期: 2015-02-14

资助项目: 国家自然科学基金项目(41106088); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院南海水产研究所)资助项目(2014-A01YY03, 2012TS01); 珠江科技新星计划项目(2013J2200092); 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室开放基金(LMB131005)

作者简介: 李旭光(1989-), 男, 硕士研究生, 从事浅海养殖生态与微生物研究。E-mail: lxguangxl@163.com

通信作者: 黄洪辉(1972-), 男, 博士, 研究员, 从事海洋生态与环境保护研究。E-mail: huanghh@scsfi.ac.cn

古菌(Archaea), 亦称古细菌(Archaeobacteria), 是自然界生物三大类群之一<sup>[1]</sup>。古菌广泛存在于土壤、湖泊和海洋等全球各种生态系统中<sup>[2-5]</sup>, 在海洋生物圈中起着极其重要的作用, 影响着海洋生态系统碳(C)、氮(N)、硫(S)和铁(Fe)等元素的循环<sup>[6-10]</sup>。由于古细菌对极端环境具有特殊的适应机制, 之前普遍认为古菌主要分布于深海极端环境中, 对其研究也主要集中在深海区域, 虽然近年来在沿岸海域也发现有大量古菌存在<sup>[11]</sup>, 但国内外目前关于近岸海域古菌群落的研究依然相对较少<sup>[12]</sup>。

由于近岸海域更易受到沿岸径流和人类活动的影响, 环境复杂多变, 这一区域的古菌群落结构也更具复杂性和独特性<sup>[2,9]</sup>。规模化浅海养殖活动改变了海水中悬浮颗粒物扩散和沉降, 进而改变了海底沉积物的理化性质<sup>[13-14]</sup>。沉积物中古菌群落也很可能受到了影响, 但是关于近岸养殖海域沉积物古菌群落的特征还未见报道。

古菌生物群落结构的研究是了解其生态功能的前提和基础。由于绝大多数古菌都很难分离和培养<sup>[15]</sup>, 传统微生物学实验手段不能用于古菌研究, 因此目前大多采用新型的分子生物学技术手段进行古细菌生物群落的研究。高通量测序(high-throughput sequencing)技术是近年来建立的基于大分子rRNA及其基因结构的分子生物学技术, 摆脱了依赖于微生物分离培养的实验方法, 可一次性测定几

十万到几百万条DNA序列, 序列覆盖范围更广, 能更全面反映古菌群落生物多样性特性, 为深入研究古菌群落特征提供了极大可能<sup>[16]</sup>。

文章采用基于MiSeq平台的高通量测序技术, 研究了典型的亚热带海湾——大亚湾大鹏澳养殖区沉积物中古菌的群落结构特征, 并以非养殖区为对照作比较分析。文章初步探讨了大鹏澳海域沉积环境古菌群落结构, 为揭示近海规模化养殖对生态系统的影响提供了基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 采样地点

大亚湾是典型的亚热带半封闭型海湾, 大鹏澳位于大亚湾西南侧, 面积约14 km<sup>2</sup>, 平均水深约7 m。大鹏澳<sup>[17]</sup>是大亚湾内主要海水养殖区, 近年来湾内主要开展葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*)筏式养殖和鱼类网箱养殖, 网箱养殖的主要品种有鲷科鱼类、鲈、鲳和石斑鱼等。

### 1.2 样品采集

于2014年8月用柱状采泥器在大鹏澳葡萄牙牡蛎筏式养殖区(oyster farm, OF)、鱼类网箱养殖区(fish farm, FF)和非养殖区(non-aquaculture, NA)采集了直径8 cm, 长40~45 cm的圆柱状沉积物样品。采样站位见图1。每个区域采集2管柱状样, 样品在冰盒中保存送至南海水产研究所深圳试

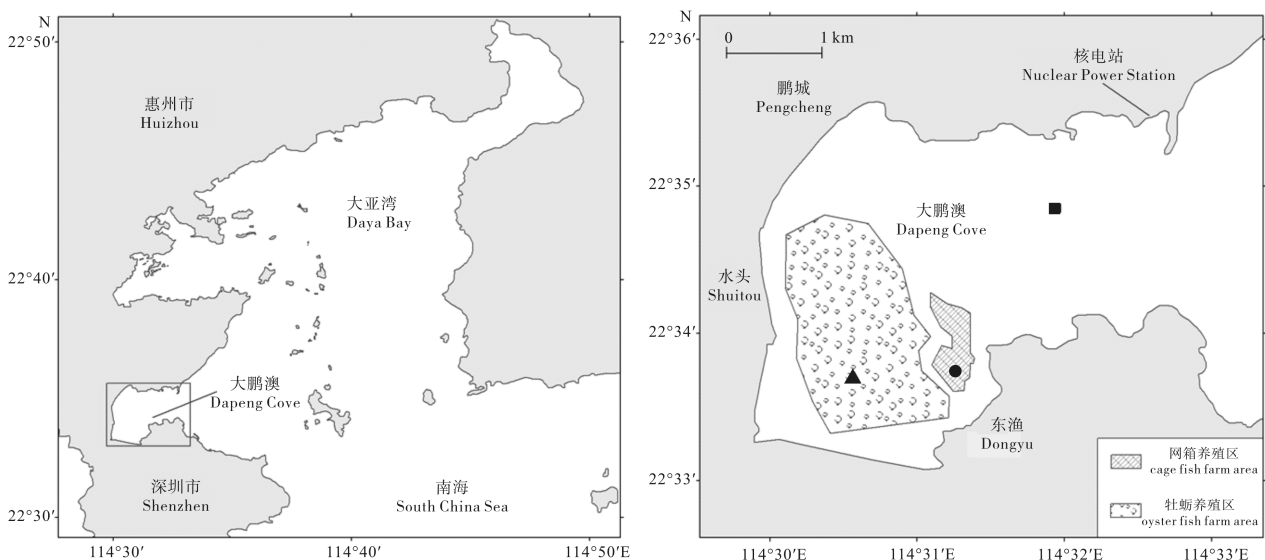


图1 大亚湾(a)和大鹏澳(b)的地理位置及采样站位

“▲”、“●”和“■”分别代牡蛎筏式养殖区、鱼类网箱养殖区和非养殖区

Fig. 1 Sampling sites in Daya Bay (a) and Dapeng Cove (b)

“▲”, “●” and “■” represent the sampling sites in oyster farm, fish farm and non-aquaculture area, respectively.

验基地实验室,并用灭菌的钢尺切割为表层(0~5 cm)和深层(30~40 cm)。同一区域2个柱状样相同深度的样品充分混匀后装入已灭菌的离心管,于-80℃保存。

### 1.3 沉积物样品 DNA 提取与检测

称取牡蛎养殖区表层(oyster farm surface, OFS)和深层(oyster farm deep, OFD),网箱养殖区表层(fish farm surface, FFS)和深层(fish farm deep, FFD),以及非养殖区表层(non-aquaculture area surface, NAS)和深层(non-aquaculture area deep, NAD)沉积物样品各0.5 g,用Fast DNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil试剂盒(Mpbio, USA)提取样品总DNA。提取方法按照试剂盒说明书进行。DNA先用1%的琼脂糖凝胶电泳检测,检测合格后再通过16S rRNA全长PCR检测,所用引物为27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT'-3')。PCR反应体系包含1.5 μL 10×PCR缓冲液(不含Mg<sup>2+</sup>, TaKaRa),1.2 μL氯化镁(MgCl<sub>2</sub>)(25 mmol·L<sup>-1</sup>, TaKaRa),1.2 μL dNTPs(2.5 mmol·L<sup>-1</sup>, TaKaRa),0.6 μL上下游引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>),0.3 μL胎牛血清蛋白(100 mg·mL<sup>-1</sup>, Roche)和0.075 μL rTaq DNA聚合酶(5 U·μL<sup>-1</sup>),模版DNA 0.5 μL,最终用去离子水补充至15 μL。反应条件设置为95℃预变性3 min;30个循环,95℃变性40 s、55℃退火40 s、72℃延伸1 min;最终72℃延伸7 min。对扩增产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳,用DL2000(TaKaRa, Japan)作为标准分子量标记,所得到的目的DNA片段大小约为1500 bp,符合MiSeq高通量测序要求。

### 1.4 MiSeq 平台高通量测序

选取16S rRNA的V4区序列进行高通量测序分析。PCR扩增引物为515F/806R,其中反向引物包含1条6 bp的条形码。PCR反应的30 μL体系包含15 μL Phusion<sup>®</sup>高保真PCR混合剂(New England Biolabs),0.2 μmol·L<sup>-1</sup>的正反引物以及10 ng的模版DNA。PCR反应条件为98℃预变性1 min,30个循环,50℃退火30 s,72℃延伸60 s,72℃最终延伸5 min。PCR产物通过2%的琼脂糖凝胶电泳检测并用GeneJET凝胶回收试剂盒(Thermo Scientific)对PCR产物纯化和回收;用NEB Next<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> DNA Library Prep Kit for Illumina(NEB, USA)试剂盒构建克隆文库并在Illumina MiSeq平台(Illumina, California USA)测序。

### 1.5 数据分析

扩增序列处理,截去条形码和引物序列。通过Flash 1.2.7软件对序列进行拼接,用Qiime 1.7.0软件进行更加精确与严格的序列质量检测与筛选,最终得到有效序列。碱基测序精度用Q值表示,  $Q = -10 \log_{10}(E)$ , E值代表每个碱基的测序错误率。Q20和Q30的值分别表示碱基质量值为20(测序错误率小于1%)和30(测序错误率小于0.1%)的碱基所占百分比。MOTHUR软件进行OTU计算,相似性等于或大于97%的序列(3% cutoff)归为同一分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。采用MEGA 6.06软件进行系统发育分析,系统进化树用邻位相连法(neighbor-joining, NJ)构建,Clustal X2进行多序列比对, Kimura 2-parameter模型进行估算,自举值(bootstrap)设为1000重复。

## 2 结果

### 2.1 MiSeq 测序序列质量分析

不同样品有效序列数、长度和有效性检测结果见表1。各区域样品测序得到的有效序列数范围为21355~70010条,FFS和NAD样品分别具有最多和最少的有效序列。有效序列的长度在254 bp左右,与预期的片段大小相符合。Q20和Q30的值分别在98.5%和95.6%以上,说明测序数据精确可信。

### 2.2 大鹏澳沉积物古菌群落空间分布特征

大鹏澳不同区域沉积物中古菌OTU数量占总原核微生物的比例差异明显,范围为5.61%~49.10%,FFD和FFS分别具有最高和最低值(表2)。古菌占总原核微生物的比例在空间分布上具有很大差异,OFS、OFD、FFS、FFD、NAS和NAD样品中古菌比例分别为12.42%、44.09%、5.61%、49.10%、6.19%和13.43%。养殖区深层样品的古菌比例明显高于非养殖区,OFD和FFD的古菌比例均高于对照区3倍以上;OFS古菌比例约为FFS的2倍,而2个养殖区深层样品中古菌比例差异不大。大鹏澳沉积物古菌在垂向分布上也存在明显异质性,均是深层样品的古菌占比例高于表层,而且表、深层之间的差异在养殖区最为显著,FFD沉积物中古菌比例约为FFS的9倍,而NAD古菌比例仅为NAS的2倍。这些结果表明大鹏澳沉积物古菌群落结构及分布存在明显的空间异质性。

表1 样品的有效序列数、长度和有效性检测结果

Tab. 1 Number, average length and effectiveness of valid sequences

样品 sample	有效序列数/条 valid sequence/tag	长度/nt average length	Q20/%	Q30/%
牡蛎养殖区表层 OFS	54 615	254	98.70	96.07
牡蛎养殖区深层 OFD	49 091	255	98.56	95.72
网箱养殖区表层 FFS	70 010	253	98.51	95.79
网箱养殖区深层 FFD	69 089	255	98.52	95.66
非养殖区表层 NAS	62 092	253	98.52	95.80
非养殖区深层 NAD	21 355	254	98.70	96.12

表2 大鹏澳沉积物中古菌占原核微生物的比例

Tab. 2 Proportions of sediment archaea in prokaryotic microorganisms in Dapeng Cove

样品 sample	OFS	OFD	FFS	FFD	NAS	NAD
古菌占原核生物比例/% percentage	12.42	44.09	5.61	49.10	6.19	13.43

### 2.3 大鹏澳古菌群落生物多样性分析

养殖区沉积物古菌群落的多样性指数总体上低于非养殖区(表3)。养殖区表层样品古菌多样性指数和均匀度指数高于深层样品,而 Simpson 优势集中性指数则低于深层样品。非养殖区表层和深层的多样性指数差异不大。古菌群落生物多样性在养殖

区与非养殖区的表层没有太大差异,但在深层的差异相对较为明显。非养殖区表层和深层之间古菌群落均匀度指数的差异小于养殖区,说明古菌在表层和深层的分布相对均匀。养殖区深层沉积物的优势集中性指数高于表层,而非养殖区没有发现这种差异。

表3 大鹏澳沉积物中古菌群落多样性指数

Tab. 3 Diversity index of sediment archaea in Dapeng Cove

样品 sample	Shannon 多样性指数 ( $H'$ )	物种均匀度指数 ( $E'$ )	Simpson 优势集中性指数 ( $C$ )
牡蛎养殖区表层 OFS	4.71	0.78	0.02
牡蛎养殖区深层 OFD	4.44	0.74	0.03
网箱养殖区表层 FFS	4.76	0.79	0.02
网箱养殖区深层 FFD	4.32	0.72	0.04
非养殖区表层 NAS	4.70	0.78	0.02
非养殖区深层 NAD	4.80	0.80	0.02

### 2.4 大鹏澳古菌群落生物序列分析与空间分布

序列比对结果显示大鹏澳沉积物中古菌共17纲,28目,37科,37属,OFS、OFD、FFS、FFD、NAS和NAD样品古菌分别有17、15、16、17、17和14纲。选取丰度最高的10个纲的古菌作图。大鹏澳海域沉积物古菌分属泉古菌(Crenarchaeota)和广古菌(Euryarchaeota)2个大类,泉古菌在古菌群落中占据绝对优势,平均序列数占总序列数的79.53%(35.39%~90.66%)。大鹏澳沉积

物中泉古菌门古菌包含9个类群,各类群在6个样品中所占比例分别为MCG(Miscellaneous Crenarchaeotic Group, 24.13%~84.10%)、MBGB(Marine Benthic Group B, 2.22%~7.53%)、MHVG(0.46%~0.51%)、THSCG(0.09%~0.85%)、Thaumarchaeota(0~1.83%)、MBGA(0.09%~0.70%)、AAG(0~0.22%)以及2种未鉴定种类的古菌(1.17%~3.51%)(图2)。不同区域样品中泉古菌分布存在差异,OFD和NAD样品中没有发

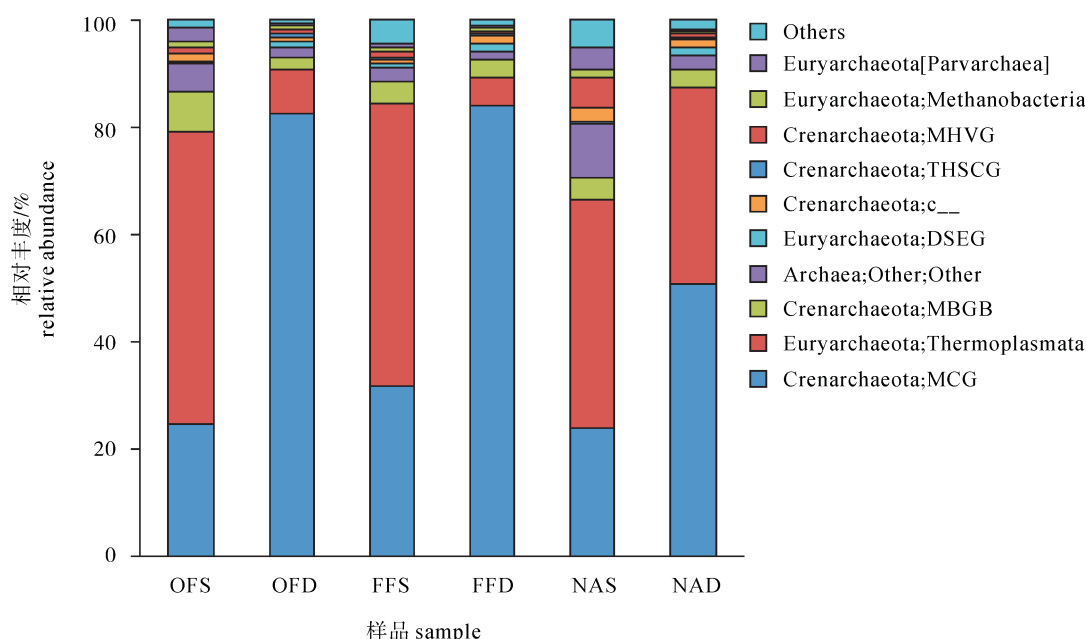


图2 大鹏澳沉积物古菌群落组成及相对丰度

Others 表示相对丰度最高的 10 个纲之外的所有门类的总相对丰度

Fig. 2 Composition and relative abundance of sediment archaea in Dapeng Cove

Others represent total relative abundance of archaea species except those from the most abundant 10 classes.

现 Thaumarchaeota, NAD 中不含有 MBGA。广古菌门古菌分属 8 个类群, 分别为热原体纲 (Thermoplasmata, 5.15% ~ 54.51%)、Parvarchaea (0.14% ~ 2.26%)、DSEG (0.44% ~ 1.65%)、Methanobacteria (0.48% ~ 1.66%)、Methanomicrobia (0 ~ 1.75%)、Micrarchaea (0 ~ 0.09%) 和 2 类未鉴定种类的古菌 (0.10% ~ 0.39%)。广古菌在不同区域样品的分布也存在差异, OFD 样品没有发现 Methanomicrobia, 而只有很少量的 Micrarchaea 在 OFS 和 NAS 样品中存在, 其余样品中均未发现。

大鹏澳沉积物中古菌群落的优势种属于广古菌门的 Thermoplasmata, 泉古菌门的 MCG 纲和 MBGB 纲, 这 3 个纲古菌占总量的 66.60% ~ 91.48%。表层和深层沉积物中古菌群落的优势种也存在差异, 表层沉积物中古菌群落的优势种均属于广古菌门的热原体纲, 其所占比例为 50.79% ~ 59.34%, 而深层沉积物中优势种均来自于泉古菌门的 MCG 纲, 所占比例为 57.89% ~ 90.66%。深层沉积物中优势种在群落中的优势度比表层更明显。

不同区域古菌群落优势种也存在差异, 养殖区表层热原体纲古菌的相对丰度明显高于深层 (OFS、OFD 分别为 54.27%、8.13%; FFS、FFD 分别为 52.65%、5.14%), 但该古菌的相对

丰度在 NAS 和 NAD 之间相差不大 (分别为 42.35% 和 36.54%)。值得注意的是, 在 NAS 样品中一种未被鉴定的古菌数量比例 (约为 10%) 超过了 MBGB 纲, 成为第三优势菌, 而其他样品中第三优势古菌均属 MBGB 纲。另外, 一种广古菌门古菌 (未鉴定到纲水平) 只在养殖区沉积物深层中出现, 而在非养殖区没有发现, 反映了古菌分布的空间异质性。

## 2.5 系统发育分析

大鹏澳沉积物古菌系统发育树见图 3。系统发育树的分支可归为泉古菌门和广古菌门两大类, 分别包含 5 和 7 个纲。泉古菌门的丰度高于广古菌门, 但两者所含种类数相近。有一种古菌并未鉴定到门, 但其与泉古菌门较为接近。表层沉积物的优势菌群——热原体纲的分支最多, 都为 E2 目, 鉴定出的古菌分属 7 个科。深层沉积物的优势菌群——MCG 纲古菌的生物多样性也较高, 占据了系统发育树的 5 个分支。同一纲中进化距离相近的种类, 如 *Candidatus Nitrososphaera-SCA1170* 等氮循环相关氨氧化古菌, 以及热原体纲的古菌都聚合到一起。系统发育树下方 Parvarchaea 纲分支与其他古菌距离相对较远, 表明古菌进化具有多样性和特殊性的特征。

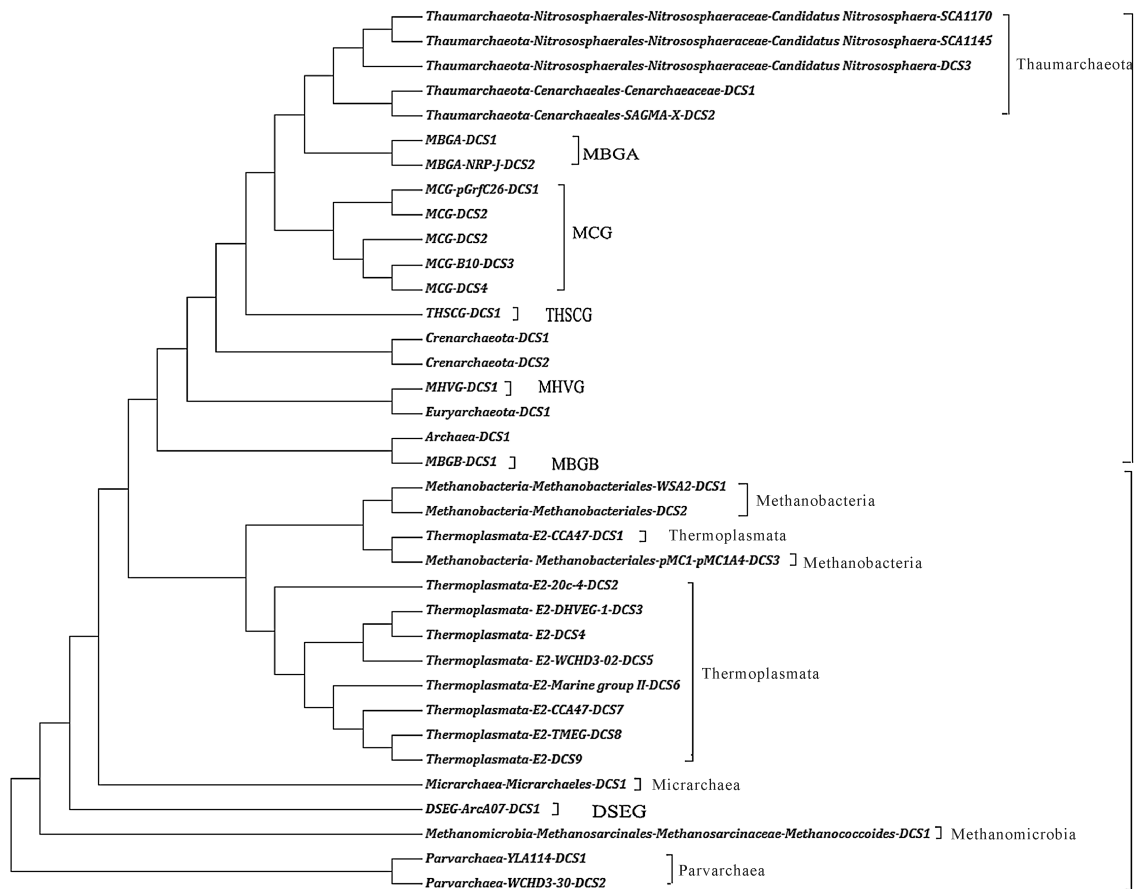


图 3 大鹏澳沉积物中古菌 16S rRNA 基因序列系统发育树

DCS 表示未鉴定的种类

Fig. 3 Phylogenetic tree of archaeal 16S rRNA gene in Dapeng Cove sediments

DCS (Dapeng Cove sediments spices, DCS) represents unidentified species.

### 3 讨论

古菌的进化与环境密切相关，其群落结构的演变是对环境变化做出的适应性反馈，因此其可以作为特定地质环境的标志物<sup>[18]</sup>。大鹏澳沉积物古菌主要为泉古菌门和广古菌门，这与在苏禄海<sup>[19]</sup>和西北大西洋<sup>[20]</sup>的研究结果相一致。KARNER 等<sup>[21]</sup>报道太平洋海域的泉古菌为沉积物古菌群落的优势种，而大鹏澳沉积物古菌群落优势种属广古菌门热原体纲，说明古菌在近岸区域与深海海域的分布存在一定的差异。大鹏澳不同区域各类群古菌群落的相对丰度及比例间的差异，表明养殖活动可能对古菌群落结构造成了影响。养殖区古菌的多样性和物种分布均匀度均有所降低，而优势种的相对丰度和优势度更加明显，这与陈明明等<sup>[12]</sup>对象山港网箱养殖区古菌研究的结果相一致。大鹏澳古菌群落结

构在不同区域和深度上的变化，一定程度上反映了沉积环境在小尺度上存在明显的空间异质性。

在西北大西洋等海域的研究报道中古菌数量约占沉积物原核生物总量的 1%~12%<sup>[11,20,22-23]</sup>，大鹏澳非养殖区域沉积物中古菌比例约为 9.8%，在此范围之内，而养殖区古菌比例约为 44%，远远高于此比例。沉积物理化特征是决定古菌(尤其是相关功能古菌)数量的重要因素。有研究发现有机质的沉积速率和埋藏通量是影响厌氧微生物矿化作用的重要因素<sup>[24]</sup>。大鹏澳养殖区沉积物中古菌比例显著高于非养殖区，可能与养殖活动向海底运输沉积了更多的有机质相关<sup>[14]</sup>。但是，关于有机质等环境因子对古菌的影响也存在相互“冲突”的结果。例如，HOU 等<sup>[25]</sup>研究东湖沉积物中氨氧化古细菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)群落分布时发现富营养化湖泊沉积物中 AOA 的数量与沉积物

中有机物的含量成反比。WESSÉ 等<sup>[26]</sup>也发现加富的土壤中 AOA 的数量与土壤有机质含量存在负相关关系。但另一方面, HERRMANN 等<sup>[27]</sup>发现在贫营养和中营养海域, AOA 数量与有机碳的含量呈正相关。这些相互“冲突”的结果说明古菌数量与环境的营养水平存在复杂的关系, 在不同的环境条件下, 对有机质输入会产生不同的响应。

沉积物中古菌的数量也可能受到氧气含量的影响。古菌代谢的多样性与嗜极生理使其能够在低氧等极端环境中生存<sup>[28]</sup>。沉积物中的氧气含量相对较低, 并且随着深度加深而急剧下降。养殖活动会导致养殖区底层沉积物有机质增加<sup>[29-30]</sup>。富含有机质的沉积物由于有机质的氧化作用, 其氧气含量会更低, 很多细菌都难以适应和生存, 从而使古菌的数量增加。大鹏澳深层沉积物中的古菌数量约是表层的 9 倍, 也证明了这一点。与该研究结果相一致, 有研究显示在海底沉积物深度超过 1 m 时, 古菌成为微生物群落的优势种<sup>[20,31]</sup>, 湖泊和湿地沉积物中古菌垂直分布也呈现相似特征<sup>[32-34]</sup>。对北极海洋沉积物古菌的研究也发现在越深越厌氧的沉积物中古菌丰度越高<sup>[22]</sup>。另外, 氧气是有机物矿化反应的最终电子受体, 直接影响有机质矿化反应和 N、磷(P)等元素的含量及其比例, 从而改变与这些元素循环代谢相关的微生物, 如与氮循环相关的硝化菌和反硝化菌的种类和数量<sup>[32,35]</sup>, LIU 等<sup>[33]</sup>也报道 AOA 的生物多样性与沉积物中可利用磷的浓度呈正相关。这些发现说明沉积环境理化因子对古菌群落存在着复杂的影响。

热原体纲在系统发育树上的分支最多并都有很好的聚类, 反映出相近的进化关系, 但也有少数同一科的古菌并未聚类在一起, 这与古菌特殊的生理机制和遗传特征有关, 也可能受到研究方法的影响。基于 PCR 片段扩增的种属鉴别方法, 根本上都是基于 16S rRNA 引物特异性的。目前大部分引物序列是在很多生境下的古菌没有发现之前所建立, 或者尚没有考虑这部分古菌的序列。PCR 扩增引物中不能匹配的序列会导致相应古菌谱系被遗漏或者无法鉴别<sup>[36]</sup>, 这些也可能是有些古菌未能鉴定种属的原因。

#### 参考文献:

[1] WOESE C R, KANDLER O, WHEELIS M L. Towards a natural

system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya [J]. Proc Natl Acad Sci, 1990, 87(12): 4576-4579.

[2] XIONG J, YE X, WANG K, et al. Biogeography of the sediment bacterial community responds to a nitrogen pollution gradient in the East China Sea [J]. Appl Environ Microb, 2014, 80(6): 1919-1925.

[3] ZHANG J, YANG Y, ZHAO L, et al. Distribution of sediment bacterial and archaeal communities in plateau freshwater lakes [J/OL]. Appl Environ Microb, 2014. DOI: 10.1007/s00253-014-6262-x.

[4] DE GANNES V, EUDOXIE G, HICKEY W J. Impacts of edaphic factors on communities of ammonia-oxidizing archaea, ammonia-oxidizing bacteria and nitrification in tropical soils [J]. PloS ONE, 2014, 9(2): e89568.

[5] 郑有坤, 王宪斌, 辜运富, 等. 若尔盖高原湿地土壤氨氧化古菌的多样性 [J]. 微生物学报, 2014, 54(9): 1090-1096.

[6] BEMAN J M. Activity, abundance, and diversity of nitrifying archaea and denitrifying bacteria in sediments of a subtropical estuary: Bahía del Tóbari, Mexico [J]. Est Coast, 2014, 37(6): 1343-1352.

[7] XU M, ZHANG Q, XIA C, et al. Elevated nitrate enriches microbial functional genes for potential bioremediation of complexly contaminated sediments [J]. ISME J, 2014, 8(9): 1932-1944.

[8] FRANCIS C A, BEMAN J M, KUYPERS M M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation [J]. ISME J, 2007, 1(1): 19-27.

[9] ABELL G, ROSS D J, KEANE J P, et al. Nitrifying and denitrifying microbial communities and their relationship to nutrient fluxes and sediment geochemistry in the Derwent Estuary, Tasmania [J]. Aquat Microb Ecol, 2013, 70: 63-75.

[10] KATO S, IKEHATA K, SHIBUYA T, et al. Potential for biogeochemical cycling of sulfur, iron and carbon within massive sulfide deposits below the seafloor [J]. Environ Microbiol, 2014. DOI: 10.1111/1462-2920.12648.

[11] DELONG E F. Archaea in coastal marine environments [J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89(12): 5685-5689.

[12] 陈明明, 王少璞, 韦梦, 等. 象山港网箱养殖区沉积物的古菌空间分布 [J]. 生态学报, 2014, 34(14): 4099-4106.

[13] MCKINDSEY C W, LECUONA M, HUOT M, et al. Biodeposit production and benthic loading by farmed mussels and associated tunicate epifauna in Prince Edward Island [J]. Aquaculture, 2009, 295(1): 44-51.

[14] BRAGER L M, CRANFORD P J, GRANT J, et al. Spatial distribution of suspended particulate wastes at open-water Atlantic salmon and sablefish aquaculture farms in Canada [J]. Aquac Environ Interact, 2015, 6: 135-149.

[15] GIOVANNONI S J, STINGL U. Molecular diversity and ecology of microbial plankton [J]. Nature, 2005, 437(7057): 343-348.

- [16] 秦楠, 栗东芳, 杨瑞馥. 高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用 [J]. 微生物学报, 2011, 51(4): 445-457.
- [17] 王肇鼎, 彭云辉, 孙丽华, 等. 大鹏澳网箱养鱼水体自身污染及富营养化研究 [J]. 海洋科学, 2003, 27(2): 77-81.
- [18] FALKOWSKI P G, FENCHEL T, DELONG E F. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles [J]. *Science*, 2008, 320(5879): 1034-1039.
- [19] 王剑飞, 萨仁高娃, 李铁刚, 等. 苏禄海深海沉积物古菌群落结构多样性研究 [J]. 地球科学进展, 2010, 25(7): 767-774.
- [20] VETRIANI C, JANNASCH H W, MACGREGOR B J, et al. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments [J]. *Appl Environ Microb*, 1999, 65(10): 4375-4384.
- [21] KARNER M B, DELONG E F, KARL D M. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean [J]. *Nature*, 2001, 409(6819): 507-510.
- [22] SAHM K, BERNINGER U. Abundance, vertical distribution, and community structure of benthic prokaryotes from permanently cold marine sediments (Svalbard, Arctic Ocean) [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1998, 165: 71-80.
- [23] HE J Z, SHEN J P, ZHANG L M, et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices [J]. *Environ Microbiol*, 2007, 9(9): 2364-2374.
- [24] NEDWELL D B. The input and mineralization of organic carbon in anaerobic aquatic sediments [M] // MARSHALL K C. *Advances in microbial ecology*. New York: Plenum Press, 1984: 93-131.
- [25] HOU J, CAO X, SONG C, et al. Predominance of ammonia-oxidizing archaea and nirK-gene-bearing denitrifiers among ammonia-oxidizing and denitrifying populations in sediments of a large urban eutrophic lake (Lake Donghu) [J]. *Can J Microbiol*, 2013, 59(7): 456-464.
- [26] WESSÉN E, NYBERG K, JANSSON J K, et al. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management [J]. *Appl Soil Ecol*, 2010, 45(3): 193-200.
- [27] HERRMANN M, SAUNDERS A M, SCHRAMM A. Effect of lake trophic status and rooted macrophytes on community composition and abundance of ammonia-oxidizing prokaryotes in freshwater sediments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(10): 3127-3136.
- [28] VALENTINE D L. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the archaea [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5(4): 316-323.
- [29] BOUCHET V M P, SAURIAU P G. Influence of oyster culture practices and environmental conditions on the ecological status of intertidal mudflats in the Pertuis Charentais (SW France): a multi-index approach [J]. *Mar Pollut Bull*, 2008, 56(11): 1898-1912.
- [30] 罗昭林, 朱长波, 郭永坚, 等. 流沙湾表层沉积物中碳, 氮, 磷的分布特征和污染评价 [J]. 南方水产科学, 2014, 10(3): 1-8.
- [31] LIPP J S, MORONO Y, INAGAKI F, et al. Significant contribution of archaea to extant biomass in marine subsurface sediments [J]. *Nature*, 2008, 454(7207): 991-994.
- [32] KOIZUMI Y, TAKII S, FUKUI M. Depth-related change in archaeal community structure in a freshwater lake sediment as determined with denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rRNA genes and reversely transcribed rRNA fragments [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, 48(2): 285-292.
- [33] LIU Y, ZHANG J, ZHANG X, et al. Depth-related changes of sediment ammonia-oxidizing microorganisms in a high-altitude freshwater wetland [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(12): 5697-7072.
- [34] YE W, LIU X, LIN S, et al. The vertical distribution of bacterial and archaeal communities in the water and sediment of Lake Taihu [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2009, 70(2): 263-276.
- [35] RUSCH A, HANNIDES A K, GAIDOS E. Diverse communities of active Bacteria and Archaea along oxygen gradients in coral reef sediments [J]. *Coral Reefs*, 2009, 28(1): 15-26.
- [36] TESKE A, SØRENSEN K B. Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? [J]. *ISME J*, 2007, 2(1): 3-18.