

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(1):132-136; 4 January 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

云南地区热泉中氨氧化菌丰度对环境条件的响应

黄秋媛¹, 蒋宏忱^{1*}, 张传伦², 李文均³, 邓诗财¹, 于炳松¹, 董海良^{1*}

(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同济大学海洋学院, 上海 200092)

(³云南大学云南省微生物研究所, 教育部微生物多样性可持续利用重点实验室, 昆明 650011)

摘要:【目的】研究热泉中的氨氧化菌对于理解全球氮循环作用至关重要, 而人们对于热泉中环境条件对氨氧化菌丰度分布的影响还知之甚少。本研究旨在研究云南热泉中氨氧化菌的丰度以及热泉环境因子(例如: 温度、氨浓度及 pH 等)对氨氧化菌丰度的影响。【方法】在所选取的热泉中, 采集沉积物、菌席或泉华样品。使用 RNA 逆转录、定量聚合酶链式反应及荧光原位杂交等技术对样品中各微生物种群进行定量分析。【结果】所选取的热泉沉积物、菌席或泉华中微生物总量大约为 $10^8 - 10^9$ 细胞/g。其中, 氨氧化古菌(AOA)占样品中微生物总量的 0.02 - 1.32%, 而氨氧化细菌数量低于检测下限。地球化学参数和 AOA 相对丰度的相关性统计分析显示, 氨氧化古菌相对丰度值与 NH_3 、 NO_2^- 、 NO_3^- 浓度和温度等具有统计学意义上的相关性, 而其与 Fe^{2+} 和盐度无统计学意义上的相关性。【结论】在所调查的热泉中, 氨氧化微生物种群主要由 AOA 组成, AOA 在热泉中的氨氧化生物地球化学过程中起着重要作用。热泉中多个环境因子一起控制着 AOA 丰度在不同热泉中的分布特征, 而某些环境因子, 如盐度和 Fe^{2+} 浓度, 可能不是控制 AOA 分布特征的关键因素。

关键词: 热泉; 环境参数; 氨氧化; 氨氧化古菌

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 01-0132-05

氮循环与一些全球现象(例如: 温室效应等)紧密相关。同时, 人类活动的影响(例如: 氮肥的施用、盐化、污染、生物扰动以及气候变化等)与氮循环也密切相关。氮循环的各个环节, 包括固氮作用($\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_3$)、硝化作用($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$), 反硝化作用($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$)以及有机氮的氨化作用等, 都与微生物活动息息相关^[1]。由于耗氧硝化过程连接着固氮作用和反硝化作用, 因此被认为是全球氮循环的重要组成部分^[2]。

耗氧硝化由两组细菌主导: 氨氧化细菌($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$)和亚硝酸盐氧化细菌($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$)。这

两组细菌都是化能自养菌。它们能够利用氮化合物氧化所释放的能量, 并固定二氧化碳, 产生有机碳。直到 5、6 年以前, 自养氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)一直被认为是许多环境(例如: 土壤、淡水、海洋水系、河口及沉积物)中唯一的耗氧氨氧化的贡献者^[3]。然而, 近年来的研究表明, 非嗜热泉古菌(Crenarchaeota)也可以进行氨氧化过程。几株化学自养氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)已经从海洋和热泉中成功分离(参考文献[4]及其引用的文献)。研究显示, 古菌的氨氧化作用是许多自然环境(如海洋水体, 海

基金项目: 中国地质大学(北京)教学实验室(中心)开放基金项目; 地质过程与矿产资源国家重点实验室特别资助项目(GPMR2008K08B); 中国教育部 111 工程(B07011)

* 通信作者。Tel: +86-1082320027; E-mail: hongchen.jiang@gmail.com; dongh@muohio.edu

作者简介: 黄秋媛(1986-)女, 福建厦门人, 理学学士, 主要从事地质微生物学及地球化学研究。E-mail: huangqiuyuan205@163.com

收稿日期: 2009-09-06; **修回日期:** 2009-10-10

洋及淡水沉积物, 土壤、及湖泊) 中的重要生命元素循环过程之一。进一步的研究表明, 在湖泊、土壤和海洋中, AOA 在数量上比 AOB 占优势 (参考文献^[5]及其引用的文献)。最近的研究显示, AOA 可以广泛存在于热泉环境^[4]。但在热泉环境中, AOA 是否也比 AOB 占优势? AOA 和 AOB 在应对一些环境因子 (例如: 温度、氨浓度及 pH 等) 变化时, 其丰度有何不同? 在本研究中, 将针对上述问题, 研究在具有不同环境因子 (如温度、pH 等) 的云南热泉中 AOA 和 AOB 丰度的变化, 以及其与环境因子之间的相关性。

1 材料和方法

1.1 样品采集与实验材料

1.1.1 样品采集与保存: 样品来源: 采样地点沿腾冲至昆明一线分布, 主要在腾冲县、龙陵县、大理洱源县及安宁市等热泉较为发育的地区进行采样。

野外现场地化参数测定: 在所有采样点中, 均用温度计检测现场热泉温度, 用同时接有 pH 和 TDS (溶解性总固体) 探头的 Hach® pH 测试仪对 pH 和 TDS 进行现场测定, 该仪器在检测 pH 的同时可检测其对应的温度。对于 NH_3 、 NO_2^- 、 NO_3^- 和 Fe^{2+} 等地球化学参数, 采用 Hach kits 进行测定。同时, 用 GPS 定位仪确定每个采样点的经纬度。

样品采集及处理: 所采样品主要为菌席和底泥, 采样工具包括清洁及灭菌处理过的铲子、漏勺及水勺。为防止样品受人为污染, 采样过程中尽量选择无菌操作。样品取出后立即置于无菌的 50 mL 离心管中, 标记及密封处理后保存于随行的液氮罐中, 回到实验室后保存于 -80°C 冰箱中。

1.1.2 主要试剂和仪器: Hach kits DR-890 (Loveland, Colorado 80539, 美国); FastRNA® Pro Soi-Direct 试剂盒 (Qbiogene, 美国); M-MLV Reverse Transcriptase RNA 逆转录试剂盒 (Promega, 美国); SYBR Green master mix (Applied Biosystems, 美国); ABI7500 定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国); Eppendorf 5417R 高速台式离心机 (Eppendorf, 德国); 激光共聚焦显微镜 VK9700 (Laica, 德国) 等。

1.2 定量聚合酶链式反应 (qPCR)

1.2.1 RNA 提取: 称取 0.5 g 样品, 用 FastRNA® Pro Soi-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)。

1.2.2 合成 cDNA (Reverse Transcription): 用上述得到 RNA 作为模板, 参照文献^[4]中的方法, 采用

M-MLV Reverse Transcriptase 逆转录试剂盒合成 cDNA。

1.2.3 定量 PCR: 用上步得到的 cDNA 作为模板, 采用通用的 amoA 基因扩增引物, 即 amoA-1F (5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3')/amoA-2R (5'-CCCC TCKGSAAAGCCTTCTTC-3') 引物对 (针对 AOB 种群)^[6] 和 Arch-amoAF (5'-STAATGGTCTGG CTTA GACG-3')/Arch-amoAR (5'-GCGGCCATCCATCTG TATGT-3') 引物对 (针对 AOA 种群)^[7], 参照文献^[4]中的方法, 对样品中的 amoA 基因的丰度进行分析测定。

1.3 荧光原位杂交

参照文献^[8], 应用 CARD-FISH (Catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization), 使用专门针对总细菌、总古菌和总泉古菌的探针 (分别为 EUB338、ARCH915 和 Cren537) 对选取样品中的相应种群进行标定, 然后在显微镜下观察并计数。

1.4 数据统计分析

参照文献^[9], 采用 *zt* 程序语言 (<http://www.psb.ugent.be/~erbon/mantel/>) 对所得试验试验数据进行统计分析。

2 结果和讨论

2.1 采集的样品

共研究了 13 个热泉, 在每个热泉中各采集一个泉底沉积物或泉华、菌席样品, 表 1 为各热泉及所采样品的基本特征。

2.2 地球化学参数结果

所选取的这些热泉, 具有一定的 pH 梯度 (2.35 - 9) 和温度梯度 (43.5°C - 94°C)。同时, 在这些热泉中其它地球化学参数也显示了有一定的梯度, 如: SO_4^{2-} , 5 - 500 mg/L; NO_2^- , 0.01 - 0.173 mg/L; NO_3^- , 0 - 0.56 mg/L; NH_3 , 0 - 1.18 mg/L; Fe^{2+} , 0 - 17 mg/L; 盐度, 597 - 7500 mg/L (表 2)。

2.3 微生物种群丰度结果

所选取的热泉沉积物、菌席或泉华中, 微生物总含量大约为 10^8 - 10^9 细胞/g。其中, 没有检测到 AOB (表中没有显示), 可能 AOB 在研究的热泉中不存在, 或其丰度太小, 低于定量 PCR 检测下限 (本次实验所设标样检测下限为 10^2 cells/g)。不过, AOB 在研究的热泉中缺失 (或低丰度), 可能预示其不适合在高温条件下生长。据笔者所知, 迄今为止, 还没有 AOB 纯系从热泉环境中被成功分离出

来。比较而言,各热泉样品中 AOA 总量达 4.5×10^4 - 1.2×10^7 cells/g, 占总微生物量的 0.02% - 1.32%, 占总古菌的 0.01% - 20.45%, 占泉古菌的 0.27% - 25.56% (表 2)。综上说明,热泉中 AOA

是氨氧化活动的主要贡献者,和在土壤及海洋中它们的 AOA 一样,热泉中的 AOA 也远比 AOB 占优势。

表 1 热泉及采集样品的基本特征

Table 1 Basic characteristic of the hot springs and collected samples

Sample	Name of hot springs	Location (N/E)	T/°C	pH	Sample description
DGG	Dagunguo (大滚锅)	24°57'12.7"/98°26'17.4"	84.0	7.64	Grey sinter
DGGEA	Dagunguo Experimental Area (大滚锅体验区)	24°57'12.7"/98°26'17.4"	87.0	2.35	Black sediment
GS	Glass Spring (眼镜泉)	24°57'03"/98°26'09.5"	94.0	9.00	Brown sediment
PS	Pearl Spring (珍珠泉)	24°57'03"/98°26'09.5"	89.5	3.50	Brown sediment
NB	Nameless Brook (无名小溪)	24°56'59.6"/98°26'15.7"	64.8	6.69	Black microbial mat
FM	Frog Mouth (蛤蟆嘴)	24°56'59.6"/98°26'15.7"	72.0	4.50	Ice-cream sinter
RB	Riverside Bathhouse (大河边澡堂)	24°39'37.2"/98°43'11.9"	44.5	7.07	Black microbial mat
BLZ1	Banglazhang#1 (邦腊掌 1 号)	24°39'23.3"/98°40'03.4"	60.0	6.30	Black sediment
BLZ6	Banglazhang#6 (邦腊掌 6 号)	24°39'23.3"/98°40'03.4"	55.0	6.67	Black sediment
NYB	Niujie Yongping Bathhouse (牛街永平澡堂)	26°15'01.2"/99°59'22.2"	70.0	7.92	Rufous sediment
L1	Laizitang#1 (癞子堂 1 号)	26°14'57.1"/99°59'31.0"	62.0	6.86	Black sediment
L2	Laizitang#2 (癞子堂 2 号)	26°14'58.3"/99°59'32.6"	80.0	7.25	Black sediment
B	No. 1 Bathhouse (天下第一汤)	24°57'45.4"/102°27'02.2"	43.5	7.07	Dark green microbial mat

表 2 采集样品地球化学参数与生物量信息特征

Table 2 采集样品地球化学参数与生物量信息特征

Sample	NO ₂ ⁻ / (μmol/L)	NO ₃ ⁻ / (μmol/L)	NH ₃ / (μmol/L)	Fe ²⁺ / (μmol/L)	Salinity / (g/L)	Cell abundance / (cells/g)				
						Bacteria ^a	Archaea ^a	Total cells ^c	Crenarchaeota ^a	AOA ^b
DGG	1.07	8.23	1.18	0.00	5.95	6.2×10^7	3.5×10^7	9.7×10^7	5.7×10^6	4.5×10^4
DGGEA	0.57	0.97	69.41	303.57	4.53	2.3×10^8	3.6×10^7	2.7×10^8	3.5×10^7	3.5×10^6
GS	1.00	9.03	0.59	0.00	5.80	3.6×10^8	1.4×10^8	5.0×10^8	1.3×10^8	2.6×10^6
PS	0.75	3.06	20.00	17.86	0.70	2.2×10^8	1.4×10^8	3.6×10^8	8.8×10^7	4.3×10^5
NB	3.68	7.58	<0.5	0.71	2.33	3.9×10^8	1.6×10^7	4.1×10^8	1.2×10^7	1.2×10^7
FM	1.14	7.58	<0.5	0.36	7.50	4.5×10^8	1.0×10^8	5.5×10^8	7.3×10^7	1.4×10^6
RB	0.07	<0.7	<0.5	0.36	0.82	1.3×10^9	1.7×10^8	1.5×10^9	1.3×10^8	7.3×10^6
BLZ1	0.30	<0.7	<0.5	0.00	0.96	8.2×10^8	1.9×10^8	1.0×10^9	1.0×10^8	1.3×10^6
BLZ2	0.23	<0.7	1.18	0.00	1.00	6.7×10^8	1.9×10^8	8.6×10^8	6.9×10^7	5.3×10^5
NYB	1.34	4.68	8.24	0.54	1.94	1.3×10^9	1.7×10^8	1.5×10^9	1.6×10^8	5.3×10^5
L1	2.52	5.81	2.94	0.54	2.19	1.5×10^9	1.6×10^8	1.7×10^9	1.3×10^8	5.6×10^5
L2	1.09	1.77	12.35	0.18	220	4.7×10^8	3.9×10^7	5.1×10^8	3.7×10^7	9.9×10^4
B	3.93	4.19	3.53	0.00	0.60	3.6×10^8	2.0×10^7	3.8×10^8	1.6×10^7	4.1×10^6

^a Data derived from FISH experiment using 16S - specific probes (No. of view fields; 30; error rate < 10.3%); ^b Archaeal *amoA* gene abundance determined using qPCR (Triplicates were performed from each sample; error rate < 7.9%); ^c Total abundance of bacteria and Archaea.

2.4 统计分析结果

为研究热泉中氨氧化古菌与其所处自然环境条件之间的关系,采用 *zt* 程序^[9] 对所得数据进行分析和研究,其中地球化学参数包括 NH₃、NO₂、

NO₃⁻、Fe²⁺、盐度、pH 和温度,生物量参数包括总古菌、总细菌、泉古菌、泉古菌、氨氧化古菌以及氨氧化古菌的相对丰度(氨氧化古菌与其他各类群丰度的比值)。*zt* 程序可计算不同地化参数和生物量之

间的线性相关系数 r 和可信参考值 P 。

统计结果显示, 温度与氨氧化古菌/泉古菌均呈正相关, 相关系数为 $+0.408$, P 值为 0.008 , 说明热泉中氨氧化菌适宜在高温条件下生存, 这也进一步验证了热泉环境中氨氧化作用较强的事实。此外, NO_2^- 浓度与 AOA/总古菌及 AOA/泉古菌的值都呈正相关, 相关系数较大, 分别为 $+0.586$ 和 $+0.425$, P 值分别为 0.017 和 0.028 , 即 NO_2^- 随着氨氧化古菌在泉古菌和古菌中比值的升高而增多, 很好地证明了氨氧化古菌确实参与了氨氧化过程从而产生 NO_2^- 。另一方面, 则发现 NO_3^- 与 NO_2^- 正好相反, 其与 AOA/总古菌的值呈负相关, 相关系数为 -0.163 , P 值为 0.027 , 说明氨氧化古菌在总古菌中占的比例越高, 能将 NO_2^- 氧化成 NO_3^- 的其他微生物含量就越少, NO_3^- 浓度随之降低。而 Fe^{2+} 浓度和盐度与 AOA 丰度分布没有统计学意义上的相关性。

3 结论

本文实验数据显示: (1) 在所调查的热泉中, AOB 可能不存在, 或其丰度低于本实验所采用探测技术极限, 预示着热泉中氨氧化微生物优势种群可能主要由 AOA 组成, AOA 在热泉中的氨氧化生物地球化学过程中起着重要的作用; (2) AOA 丰度与温度、pH、 NO_3^- 及 NO_2^- 浓度之间的相关性具有统计学意义, 意味着 AOA 在热泉中丰度分布特征是由热泉中多个环境因子的控制结果, 任何单一因子都不能独立解释热泉中 AOA 丰度的分布特征; (3) AOA 丰度与 NO_2^- 和 NO_3^- 浓度之间的统计学相关性表明, AOA 是参与热泉氨氧化过程的主要贡献者, 并且氨氧化过程的强度与 AOA 丰度成正比; (4) 碱性富氨的环境有利于 AOA 的生长, 而 AOA 丰度与 Fe^{2+} 浓度之间没有统计学意义上的相关性, 意味着 Fe^{2+} 和盐度可能不是影响 AOA 丰度分布的关键因素。

致谢 在野外采集样品和实验室内实施荧光原位杂交试验过程中, 上海交通大学于丽波同志、云南大学李岩同志和志晓阳博士、厦门大学焦念志

教授和胡安谊博士给予了大量的帮助, 在此一并表示衷心的感谢!

参考文献

- [1] Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, et al. Brock Biology of Microorganisms. 12 ed. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings, 2008.
- [2] Nicol GW, Schleper C, Ammonia - oxidising *Crenarchaeota*: important players in the nitrogen cycle? *Trends in Microbiology*, 2006, 14(5): 207-212.
- [3] Kowalchuk GA, Stephen JR. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55 (55): 485-529.
- [4] Zhang CL, Ye Q, Huang Z, et al. Global occurrence of archaeal amoA genes in terrestrial hot springs. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(20): 6417-6426.
- [5] Jiang H, Dong H, Yu B, et al. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in Qinghai Lake, northwestern China. *Geomicrobiology Journal*, 2009, 26(3): 199-211.
- [6] Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W. The ammonia monoxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (12): 4704-4712.
- [7] Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, et al. 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.
- [8] Pernthaler A, Pernthaler J, and Amann R. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(6): 3094-3101.
- [9] Jiang H, Deng S, Yu B, et al. Response of archaeal community structure to environmental changes in lakes on the Tibetan Plateau, northwestern China. *Geomicrobiology Journal*, 2009, 26(4): 289-297.

Abundance of Ammonia-Oxidizing Microorganisms in Response to Environmental Variables of Hot Springs in Yunnan Province, China

Qiuyuan Huang¹, Hongchen Jiang^{1*}, Chuanlun Zhang², Wenjun Li³, Shicai Deng¹, Bingsong Yu¹, Hailiang Dong^{1*}

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

(² School of Life Sciences, Tongji University, Shanghai, 200092, China)

(³ The Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650011, China)

Abstract: [**Objective**] Investigation of ammonia-oxidizing microorganisms (AOMs) in hot springs is of significant importance to understand global nitrogen cycling. However, we still know little about the abundance of AOMs in hot springs. In this research, the abundance of AOMs in thirteen hot springs located in Yunnan Province, China, and the effects of environmental variables (e. g. temperature, pH and ammonia concentration, and certain ions) on the AOM abundance were studied. [**Methods**] Microbial abundance in collected hot spring samples was determined by using an integrated approach including reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction and catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridisation. [**Results**] Total biomass in the collected hot spring samples was $10^8 - 10^9$ cells/g, among which ammonia-oxidizing archaea (AOA) occupied 0.02% - 1.32%, whereas no ammonia-oxidizing bacteria were detected. Statistical analysis indicated that AOA abundance was significantly ($P < 0.05$) correlated with concentrations of NH_3 , NO_2^- , NO_3^- , pH and temperature, but not related ($P > 0.05$) to salinity and concentrations of Fe^{2+} and salinity. [**Conclusion**] AOA were the major component of AOM in the studied hot springs, and play an important role in ammonia oxidation in hot springs. Multiple environmental variables (e. g. NH_3 , NO_2^- , NO_3^- , pH and temperature) were together controlling the AOA distribution among hot springs of different conditions, and some environmental variables, such as Fe^{2+} and salinity may not be the key factors for AOA in hot springs.

Keywords: hot springs; environmental variables; ammonia oxidation; ammonia-oxidizing archaea

(本文责编: 张晓丽)