

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (12) :1462 – 1470; 4 December 2014
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.12.009

云南热泉中氨氧化古菌的 *accA* 基因与 *amoA* 基因丰度与环境因子 NO_2^- 和 NO_3^- 的相关性

宋兆齐^{1,2}, 王莉¹, 周恩民², 王风平³, 肖湘³, 张传伦⁴, 李文均^{2,5*}

¹ 商丘师范学院生命科学学院, 生物精炼河南省工程实验室, 河南 商丘 476000

² 云南大学云南省微生物研究所, 西南微生物多样性教育部重点实验室, 云南 昆明 650091

³ 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

⁴ 同济大学海洋学院, 海洋地质国家重点实验室, 上海 200092

⁵ 中山大学生态与进化学院, 广东 广州 510275

摘要: 【目的】氨氧化古菌 (ammonia-oxidizing archaea, AOA) 可能通过近期刚发现的 3-羟基丙酸盐/4-羟基丁酸盐途径 (3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle, HP/HB) 来固定 CO_2 , 在海洋和土壤环境下进行化能自养型生长。云南热泉系统已被证明具有丰富的 AOA 多样性。本论文旨在调查云南不同热泉中, 这种 CO_2 固定途径的关键酶——乙酰辅酶 A 羧化酶基因 *accA* 和古菌氨单加氧酶基因 *amoA*, 及原核微生物 16S rRNA 基因的丰度变化, 以及它们与环境因子的相关性。【方法】选择 20 处代表性热泉沉积物样品, 通过荧光定量 PCR 技术, 获得各目的基因丰度; 利用 R 软件包对各样点地化参数进行主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA), 并通过 Mantel test 检验各目的基因和地化参数间的相关性。【结果】细菌和古菌 16S rRNA 基因的丰度范围分别在 6.6×10^7 至 4.19×10^{11} 和 1.27×10^6 至 1.51×10^{11} 拷贝/g 沉积物; 古菌 *accA* 和 *amoA* 基因的丰度范围为 8.89×10^3 至 6.49×10^5 和 7.64×10^3 至 4.36×10^5 拷贝/g 沉积物, Mantel test 结果显示 *accA* 和 *amoA* 基因丰度间具有极显著的相关性 ($R = 0.98, P < 0.001$), 两者又分别都与热泉内的 NO_2^- 和 NO_3^- 浓度存在显著相关, 与 pH 值等其它环境因子没有明显统计学意义上的相关性。【结论】云南地区热泉间的细菌和古菌丰度, 以及两者比例关系都存在较大差异; 相关性的统计结果进一步证明了热泉环境下的氨氧化古菌是通过 HP/HB 途径进行 CO_2 固定; 本次研究并未发现氨氧化古菌的丰度与环境 pH 存在明显统计学意义上的相关性, 这与常温土壤环境的相关研究结果存在不同。

关键词: 云南热泉, 原核微生物丰度, 氨氧化古菌, *accA* 基因, *amoA* 基因, 荧光定量 PCR

中图分类号: Q939 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 12-1462-09

氨氧化过程是硝化作用的第一步, 在全球氮元素循环中发挥着极为重要的作用。经过近些年不断

基金项目: 科技部国际合作专项 (2013DFA31980); 国家自然科学基金项目 (31300430); 云南省自然科学基金重点项目 (2013FA004); 河南省基础与前沿项目 (132300410201)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-871-65033335; E-mail: wjli@ynu.edu.cn, liact@hotmail.com

作者简介: 宋兆齐 (1979-), 男, 河南新乡人, 博士, 讲师, 主要从事微生物生态学研究。E-mail: xiaozhou_1979@126.com

收稿日期: 2014-04-08; **修回日期:** 2014-06-04

研究,人们已经证明了在诸如海洋和土壤等大多数生态系统中,该过程最主要的推动者是氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)^[1-2],而非先前普遍认为的细菌类群。AOA 起初被划入常温型泉古菌,后来的研究建议将常温泉古菌定义为一个独立的门——奇古菌门(*Thaumarchaeota*)^[3-4]。

氨氧化古菌可营化能自养型生长,从氨的氧化中获得能量来维持二氧化碳固定^[1]。其固定方式是通过近期发现的一种新途径完成的,即:3-羟基丙酸盐/4-羟基丁酸盐途径(3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle, HP/HB)^[5-6]。乙酰辅酶 A 羧化酶是该途径的一个关键酶^[7],而此酶在细菌细胞中主要催化脂肪酸合成^[8]。*accA* 基因编码这一酶的 α 亚基,近期已经作为一种分子标记,并结合古菌氨单加氧酶基因(*amoA*),用于研究海洋和土壤等环境下氨氧化古菌的丰度和多样性^[9-14]。研究结果表明 HP/HB 固定途径和氨氧化过程存在着显著的关联,同时由于氨氧化古菌在多数生境中存在较高的细胞丰度与活性,因此这一类群不仅在氮循环,而且可能在全球碳元素循环中发挥着重要作用。

陆地热泉具有高温、缺氧和物化背景复杂等特征,是一种经典极端环境。目前的研究结果已表明:氨氧化古菌在冰岛^[15]、俄罗斯勘察加^[15-16]、美国黄石^[17-18]和内蒙^[18]地区的热泉中广泛存在。近几年,笔者所在科研团队与相关合作单位对我国云南地区热泉中的氨氧化古菌多样性开展了系列研究。获得如下结果:与其它地区热泉一样,古菌 *amoA* 基因广泛存在于不同温度(43.6 - 94℃)和酸碱度(pH:2.4 - 9.0)的云南热泉中^[18-19],遗传多样性丰富,甚至可在高达 94℃ 的环境下表达^[19]。最近,我们还研究了云南部分热泉中古菌 *accA* 基因的多样性,结果显示,该基因遗传多样性同样丰富,也可在 90℃ 以上的环境下表达,这表明云南热泉中的氨氧化古菌很可能通过 HP/HB 途径进行自养生长^[20]。然而,我们对云南各热泉中 *accA* 基因的丰度,目前还没有足够认识。此外,云南地区拥有极其丰富的地热资源,虽然学者们已针对云南热泉中的生物多样性开展了大量工作,并有了非常深入的认识,但是针对该环境下原核微生物的丰度变化,目前还缺乏相对全面的调查。

基于上述情况,本论文尝试基于荧光定量 PCR 技术和数理统计原理,针对云南地区的 20 处代表性热泉,研究以下内容:(1) 不同样点间原核微生物的

丰度差异;(2) 古菌 *accA* 和 *amoA* 基因丰度和两者间的相关性,以及环境因子对两者丰度的影响。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

温度探头 Portable meter (PT-10, SARTORIUS, 德国);HACH colorimeter (model CEL 850/product #: 2687900, Hach Chemical Co., Iowa, 美国);环境 DNA 提取试剂盒 E. Z. N. A.® Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek Inc., 美国);Inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS, Thermo, 美国);荧光定量 PCR 试剂 SYBR® PREMIX TaqTM (2 ×) (TaKaRa, 大连);ABI7500 realtime thermal cycler (ABI, 美国)。

1.2 样品采集和水化参数测量

取热泉沉积物放入 50mL 无菌离心管中,立刻浸入随行的液氮罐内,转运到实验室后 -80℃ 保存。分别运用便携式探头和 pH 精密试纸测定热泉温度和酸碱度。通过 HACH colorimeter 对水体的 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 和 Fe^{2+} 浓度进行现场测定, SiO_4^{2-} 、Ca、K、Mg、Mn 和 Na 的浓度在实验室内通过 Inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS) 测定。

1.3 环境基因组提取

称取 0.2 到 1.2 的沉积物样品,采用 E. Z. N. A.® Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek Inc., USA) 试剂盒,按说明书进行环境总 DNA 的提取。每个样点重复提取 4 次后将提取物混合,供后续试验。

1.4 定量 PCR 实验

细菌和古菌 16S rRNA 基因以及古菌 *accA* 和 *amoA* 基因的定量 PCR 引物见表 1。每样点进行 3 个重复。所用设备为 ABI7500 realtime thermal cycler。反应体系为 25 μL ,包含 12.5 μL SYBR® PREMIX TaqTM (2 ×),20 - 50 ng 环境基因组 DNA 和 10 pmol 引物。反应程序采用三步法:预变性为 95℃ 3 min;变性为 94℃ 15 s,退火为 45 s(具体温度见表 1),延伸为 95℃ 30s(收集荧光信号),40 个循环;随后进行熔解曲线分析。分别将实验室保藏的细菌菌株 *Shewanella piezotolerans* WP3 和古菌菌株 *Natronomonas* sp. 的 16S rRNA 基因,作为本研究古菌和细菌 16S rRNA 基因定量 PCR 的标准品;古菌 *accA* 和 *amoA* 基因的标准品选自先前构建的相应文库内的克隆质粒。标准品梯度范围为 ($10^2 - 10^8$) / μL 个基因拷贝。

表 1. 本研究所用 PCR 引物
Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequence (5' →3')	Target group	Annealing temp. /°C	Usage	Reference
Bac331F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT				
Bac797R	GGA CTACCAGGCTCTAATCCTGTT	Bacterial 16S	60	qPCR	[21]
Bac27F	AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG	rRNA gene			
Univ1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT		56	PCR for standard templates	[22]
Arch349F	GYGCASCAGKCGMGA AW				
Arch806R	GGA CTACVSGGTATCTAAT	Archaeal 16S	60	qPCR	[23]
Arch21F	TTCYGGTTGATCCYGC CRGA	rRNA gene			
Arch958R	CGGTTACCTTGTTACGACTT		55	PCR for standard templates	[22]
Crena_529F	GCWATGACWGAYTTTGT YRTAATG	Archaeal <i>accA</i> gene	50/52	qPCR and for standard templates	[9]
Crena_981R	TGGWTKRYTTGCAAYTATWCC				
Arch-amoAF	STAATGGCTGGCTTAGACG	Archaeal <i>amoA</i>		qPCR and for standard templates	
Arch-amoAR	GCGCCATCCATCTGTATGT	gene	56	templates	[24]

1.5 统计学分析

在 R2.6.0 软件中载入用于生态学统计的 Vegan 程序包, 导入样点的水化学数据并进行标准化, 随后进行主成分分析 (Principal Component

Analysis, PCA)。分别计算各样点间的水化参数、温度、pH 以及各基因拷贝数的距离矩阵, 然后进行 Mantel test 相关性检测。

表 2. 本研究的热泉基本特征
Table 2. Description of hot spring samples investigated in this study

Sample	Sample description	GPS location (N/E)	T/°C	pH
Zzq (腾冲珍珠泉)	Brown sandy sediment	24°57'03"/98°26'09.5"	96	4.3
Drty6 (腾冲热海体验区 6 号)	Brown sandy sediment	24°57'12.7"/98°26'17.4"	96	4
Srbzq (腾冲水热爆炸区)	Gray sandy sediment	24°57'12.7"/98°26'17.4"	95	8.8
Dgg (腾冲大滚锅)	Ashen geyselite	24°57'12.7"/98°26'17.4"	94	8.1
Hmz3 (腾冲蛤蟆嘴 3 号)	Black sediment mix mat	24°57'12.6"/98°26'17.5"	92	7.8
Gmd (腾冲鼓鸣泉)	Gray mat	24°57'12.6"/98°26'15.7"	84	9
Eng (洱源牛街古泉)	Gray sandy sediment	26°15'01.4"/99°59'22.3"	84	7.4
Hmz2 (腾冲蛤蟆嘴 2 号)	Black sediment mix mat	24°57'12.6"/98°26'17.5"	82	7.8
Eynj3 (洱源牛街 3 号)	Black sandy sediment	26°15'01.2"/99°59'22.2"	78	7.4
Hmz1 (腾冲蛤蟆嘴 1 号)	Black sediment mix mat	24°57'12.6"/98°26'17.5"	77	7.8
Gq1 (腾冲滚锅水渠 1 号)	Brown sandy sediment	24°57'12.7"/98°26'17.4"	74	4.4
Ens (洱源牛街水井泉)	Brown Mat	26°15'01.2"/99°59'22.7"	74	7.2
Eynj2 (洱源牛街 2 号)	Black mat	26°15'01.2"/99°59'22.2"	73	7.3
Wm3 (腾冲无名泉 3)	Gray Mat	24°57'12.6"/98°26'15.6"	70	7.2
Enp (洱源牛街公园泉)	Gray sandy sediment	26°15'01.1"/99°59'22.3"	68	7.2
Drty4 (腾冲热海体验区 4 号)	Brown sediment	24°57'12.7"/98°26'17.4"	67	3.2
Sx4 (龙陵上硝 4 号)	Black sandy sediment	24°39'23.3"/98°40'03.4"	66	8
Sx11 (龙陵上硝 11 号)	Black sandy sediment	24°39'23.3"/98°40'03.4"	66	8
Sx1 (龙陵上硝 1 号)	Black and green sandy sediment	24°39'23.3"/98°40'03.4"	53	6
Drty14 (腾冲热海体验区 14 号)	Brown sediment	24°57'12.7"/98°26'17.4"	47	4.5

表 3. 各热泉水化学参数

Table 3. Water chemistry of the investigated hot springs^a

Sample	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	Fe ²⁺	SiO ₄ ²⁻	Ca	K	Mg	Mn	Na
Zzq	164.27	2.21	5.49	0.201	645.68	3.901	25.32	0.5995	0.521	59.64
Drty6	2.18	0.13	2.22	2.087	675.93	38.302	31.4	1.1038	0.679	66.3
Srbzq	BD	0.83	2.86	BD	545.12	1.75	116.4	0.1197	BD	387.4
Dgg	BD	0.36	3.35	BD	677.39	1.75	116.4	0.1197	BD	387.4
Hmz1&2&3 ^b	0.56	0.67	3.9	BD	679.22	1.975	69.32	0.1429	BD	299.3
Gmd	36.36	0.24	3.26	BD	679.76	1.39	96.38	0.11	BD	364.7
Eng	115.94	2.32	8.47	BD	581.04	37.06	38.51	14.04	0.034	206.3
Eynj3	441.85	BD	2.34	BD	677.57	39.61	47.12	18.07	0.1135	235.2
Gq1	BD	0.8	2.65	6.756	678.94	2.886	67.16	0.1952	BD	296.7
Ens	BD	2.96	6.86	BD	678.39	3.503	13.51	0.2508	BD	139.2
Eynj2	BD	0.48	1.88	BD	643.7	37.06	38.51	14.04	0.034	206.3
Wm3	96.49	3.29	39.84	BD	173.37	1.42	83.84	0.086	BD	360.4
Enp	167.87	BD	4.18	BD	656.45	56.23	43.02	19.12	0.062	213.4
Drty4	BD	1.22	1.82	3.688	680.59	23.95	18.58	0.8083	0.0409	20.49
Sx4	382.08	0.02	2.34	BD	629.74	28.09	8.213	1.371	0.0524	73.94
Sx11	382.08	0.02	2.34	BD	629.74	28.09	8.213	1.371	0.0524	73.94
Sx1	0.76	0.67	3.88	1.017	172.33	31.03	20.3	2.318	0.1603	176.5
Drty14	BD	0.49	27.88	1.913	681.15	84.4	24.51	9.223	0.9865	47.05

a. Values are reported as milligrams per liter. b. The Hmz1 Hmz2 and Hmz3 are connected with each other and thus have same water chemistry. "BD", below the detection limit (0.001 mg l/D); "ND", not determined.

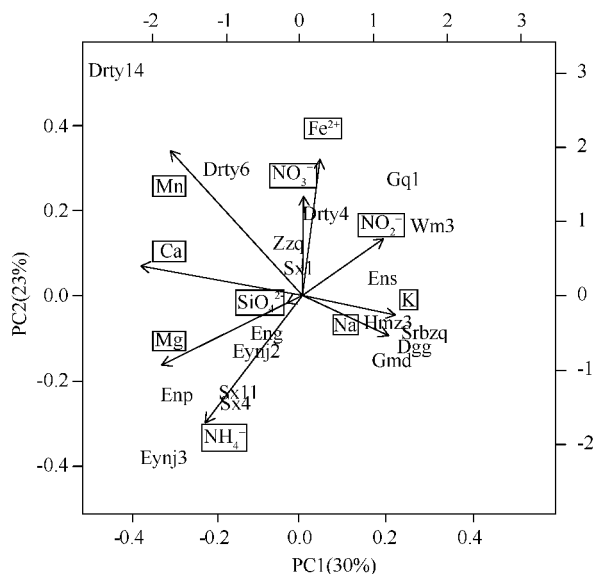


图 1. 热泉地化参数的组成成分分析

Figure 1. The first two principal coordinate axes (P1 and P2) for PCA and the distributions of sampling locations in response to these axes. Rectangles represent chemical factors.

2 结果和讨论

2.1 各样点的环境背景

本研究选择 20 处热泉, 分布于云南中西部, 在

龙陵、腾冲和洱源一线。这些样点间的温度和 pH 值跨度较大, 分别为 96–47℃ 和 3.2–9.0。沉积物类型可分为菌藻席和砂石型两大类, 每种类型的颜色大体可分为黑、棕、灰等(表 2)。各样点的化学参数存在比较明显的差异, 并呈现一定的浓度梯度变化, 如 NH₄⁺、NO₂⁻、NO₃⁻ 和 Ca 离子等(表 3)。针对 10 种化学参数的组成成分分析(图 1)也显示: 本次研究样点的化学背景差异明显。这些表明了云南地区丰富的热泉类型多样性, 也体现了本次研究样点具有较强的代表性。

2.2 细菌和古菌 16S rRNA 基因丰度

基于 16S rRNA 标准品计算出标准曲线的 R² 值大于 0.99, 扩增效率在 90%–95%, 溶解曲线为单一峰图, 表明实验结果并无引物二聚体和非特异扩增的影响。本次调查的热泉中, 细菌 16S rRNA 基因丰度变化较大, 相差了近 4 个数量级, 样点 Hmz1 的拷贝数最高, 为 4.19 × 10¹¹ 拷贝/g 沉积物, Hmz3 最低, 为 6.6 × 10⁷ 拷贝/g 沉积物; 相对于细菌, 古菌 16S rRNA 基因丰度更大, 相差了近 5 个数量级, 范围在 1.27 × 10⁶ 至 1.51 × 10¹¹ 拷贝/g 沉积物, 最高和最低的样点分别为 Sx4 和 Hmz3(表 4)。从同一地点中细菌和古菌的丰度比较来看, 不同热泉间也存在较大差异, 热泉 Sx4 中两者 16S rRNA 基

表 4. 热泉各基因的丰度

Table 4. Abundance of 16S rRNA genes and archaeal *accA* and *amoA* genes in the sediments of the studied hot springs (copies/g)

Sample	16S rRNA gene				Archaeal <i>accA</i>		Archaeal <i>amoA</i>	
	Bacteria	SD	Archaea	SD	<i>accA</i>	SD	<i>amoA</i>	SD
Zzq	2.09×10^8	9.1×10^6	1.04×10^8	1.2×10^7	2.10×10^5	1.3×10^4	1.36×10^5	1.3×10^4
Drty6	1.08×10^8	9.1×10^6	5.52×10^6	2.7×10^4	9.25×10^3	6.9×10^2	8.33×10^3	6.0×10^2
Srbzq	2.52×10^9	2.3×10^8	2.58×10^7	2.5×10^6	4.11×10^4	2.0×10^3	3.55×10^4	1.1×10^3
Dgg	9.2×10^8	1.6×10^7	1.38×10^8	8.0×10^6	2.95×10^4	3.7×10^3	2.14×10^4	6.9×10^2
Hmz3	6.06×10^7	5.3×10^5	1.27×10^6	7.9×10^3	9.94×10^3	1.9×10^2	7.64×10^3	9.4×10^1
Gmd	9.56×10^{10}	6.0×10^9	4.06×10^8	1.4×10^7	2.90×10^5	1.1×10^4	1.74×10^5	1.0×10^4
Eng	2.78×10^8	7.4×10^6	1.18×10^6	1.2×10^4	1.94×10^4	1.4×10^3	1.39×10^4	9.7×10^1
Hmz2	1.69×10^{10}	1.7×10^9	1.12×10^9	6.2×10^7	6.81×10^4	4.9×10^3	6.16×10^4	2.2×10^3
Eynj3	1.85×10^9	8.4×10^7	8.75×10^7	6.4×10^6	1.08×10^5	7.3×10^3	9.23×10^4	5.6×10^3
Hmz1	4.19×10^{11}	1.5×10^{10}	1.93×10^8	5.3×10^5	2.41×10^4	3.5×10^3	1.93×10^4	1.4×10^3
Gq1	5.24×10^8	3.0×10^7	1.84×10^7	1.1×10^4	6.88×10^4	4.3×10^3	5.51×10^4	2.8×10^2
Ens	4.94×10^9	1.3×10^8	1.26×10^7	6.3×10^5	4.83×10^5	4.9×10^4	3.84×10^5	1.4×10^2
Eynj2	1.40×10^{11}	2.4×10^9	3.92×10^9	5.8×10^7	1.22×10^5	1.3×10^3	8.88×10^4	2.1×10^3
Wm3	1.53×10^{10}	1.2×10^9	3.09×10^8	1.3×10^7	6.49×10^5	2.7×10^4	4.36×10^5	1.6×10^4
Enp	1.40×10^8	3.3×10^6	5.69×10^7	9.1×10^5	1.32×10^5	2.1×10^4	1.06×10^5	1.3×10^4
Drty4	8.95×10^8	1.0×10^7	3.00×10^7	8.4×10^5	8.70×10^4	9.6×10^2	7.98×10^4	1.5×10^3
Sx4	2.08×10^{11}	4.5×10^9	1.51×10^{11}	2.6×10^9	1.13×10^5	5.4×10^3	6.49×10^4	1.9×10^3
Sx11	3.77×10^9	5.5×10^7	8.45×10^7	2.7×10^6	8.89×10^3	5.2×10^2	9.23×10^3	8.1×10^2
Sx1	3.83×10^{10}	1.0×10^9	4.19×10^8	4.0×10^6	4.99×10^4	7.0×10^3	3.16×10^4	1.6×10^3
Drty14	1.12×10^{10}	1.5×10^9	6.65×10^6	2.8×10^5	1.44×10^4	5.1×10^2	8.67×10^3	4.7×10^2

表 5. 各基因间的丰度比例

Table 5. The ratios of different gene abundances in the sediments of the studied hot springs

Sample	Bacteria 16S rRNA gene / archaeal 16S rRNA gene	Archaeal 16S rRNA gene / archaeal <i>accA</i>	Archaeal 16S rRNA / archaeal <i>amoA</i>	Archeal <i>accA</i> / archaeal <i>amoA</i>
Zzq	2	494	766	1.6
Drty6	19	597	663	1.1
Srbzq	98	627	726	1.2
Dgg	7	4659	6422	1.4
Hmz3	48	128	166	1.3
Gmd	235	61	85	1.4
Eng	236	1401	2333	1.7
Hmz2	15	16497	18246	1.1
Eynj3	21	813	801	1
Hmz1	2168	8025	10002	1.2
Gq1	392	26	33	1.3
Ens	29	267	333	1.2
Eynj2	36	32140	44097	1.4
Wm3	49	476	710	1.5
Enp	2	431	539	1.3
Drty4	30	345	376	1.1
Sx4	1	1333256	2326401	1.7
Sx11	45	9507	9152	1
Sx1	92	8382	13230	1.6
Drty14	1684	463	768	1.7

因的拷贝数最为接近, 比例为 1.4:1, Hmz1 的差异最大, 达到了 2168:1 (表 5)。这些说明云南地区不同热泉间的原核细胞丰度存在着非常明显的不同。

通过 R 统计软件进行的 Mantel test 分析结果显示, 细菌和古菌 16S rRNA 基因丰度以及两者间的比例, 与温度、pH 以及任何单一化学参数均不存在明显的相关性 (线性相关系数 R 的绝对值小于 0.37)。笔者的课题组与相关合作单位在前期研究工作中已证明: 在原核微生物的群落结构组成上, 温度是影响云南、西藏以及俄罗斯勘察加地区热泉系统的一个支配性环境因子^[25-27]。然而本次的研究显示, 在原核生物的细胞丰度上, 很难发现影响云南热泉系统的一个关键因素, 这可能是由于热泉中的无机离子丰富而且多样^[28], 这使得彼此之间的化学背景存在较大差异, 有理由推测云南地区的热泉环境原核微生物丰度可能受到复杂环境因子的联合影响。

2.3 古菌 *accA* 和 *amoA* 基因的丰度

基于古菌 *accA* 和 *amoA* 基因标准品计算出的标准曲线的 R^2 值大于 0.99, 扩增效率在 87% - 90%, 溶解曲线为单一峰图。本次研究样点的古菌 *accA* 基因拷贝数在 10^3 至 10^5 , 热泉 Wm3 的丰度最高, 为 6.49×10^5 拷贝/g, 热泉 Sx11 的丰度最低, 为 8.89×10^3 拷贝/g。古菌 *amoA* 基因拷贝数在 7.64×10^3 至 4.36×10^5 , 丰度最高的同样为热泉 Wm3, 最低是热泉 Hmz3 (表 4)。

各样点的古菌 *accA* 与 *amoA* 的丰度基本相同, 前者与后者比值范围为 0.96 - 1.7 (表 4)。Mantel test 的分析结果显示两者存在极显著的相关性 (R 值大于 0.98, 可信参考值 P 小于 0.001)。这些数据进一步支持了我们之前基于热泉环境基因组和转录组的序列分析所获得的结果, 即: 热泉环境下的氨氧化古菌可能通过 HP/HB 途径, 进行自养型的 CO_2 固定^[20]。然而, 除了 Sx11 和 Eynj3 以外, 其余 18 处热泉的 *accA* 基因拷贝数都略高于 *amoA* 基因, 这主要因为, 在前期工作中, 我们利用同样的 PCR 引物获得了小部分非氨氧化古菌 [除硫球菌目 (*Desulfurococcales*) 物种] 的 *accA* 基因序列, 这有可能导致本研究古菌 *accA* 基因比 *amoA* 基因丰度略高。

近些年一系列有关古菌 *amoA* 及 *accA* 基因的定

量研究, 已经证明大部分的土壤和海洋系统中氨氧化古菌维持一个非常高的丰度, 例如, 欧洲大陆普通土壤中古菌 *amoA* 基因丰度在 $10^7/\text{g}$ 以上, 氨氧化古菌占到了原核微生物细胞总数的 0.9% - 5.8%^[29]; 大西洋中部海域古菌 *accA* 和 *amoA* 基因的拷贝数普遍大于 $10^4/\text{mL}$ ^[14], 我国东海和南海中海区的古菌 *accA* 和 *amoA* 基因拷贝数大于 $10^4/\text{ng}$, 氨氧化古菌占古菌总数的 50% 以上^[10-11]。本次研究的结果显示, 云南热泉氨氧化古菌无论是在细胞绝对数量, 还是所占的古菌比例上, 均远远低于土壤和海洋系统, 类似的结果也存在于俄罗斯勘察加地区热泉中^[16]。因此氨氧化古菌可能并不算陆地热泉系统内一个主要的古菌类群。这是因为陆地热泉相对于土壤和海洋环境, 含有来自地球内部更为丰富无机离子, 为更多类型古菌的生长提供条件。但是, 基于细菌 *amoA* 基因的 PCR 筛选, 学者们并未在云南和勘察加地区的热泉中探测到氨氧化细菌的存在^[18-19], 这表明氨氧化古菌虽然丰度不高, 但却很可能是陆地热泉环境下氨氧化过程的主要推动者。

最近, Gubry-Rangin 等人的研究证明了 pH 值支配了土壤环境下氨氧化古菌群落结构和细胞丰度^[30-31]。然而我们先前的工作表明 pH 值并没有显著影响陆地热泉环境下氨氧化古菌的类群组成^[20]。与此相似, 本次研究基于 R 2.6.0 软件进行 Mantel test 的分析, 并未发现 pH 值与古菌 *accA* 和 *amoA* 基因的拷贝数存在统计学意义上的相关性 (表 6)。这表明热泉与土壤环境不同, pH 值似乎并不是决定该系统下氨氧化古菌细胞丰度和群落结构的最关键因素。

分析的结果还显示, 古菌 *accA* 和 *amoA* 基因丰度与 NO_2^- 和 NO_3^- 的浓度存在较强的相关性 (表 6), 这是因为上述两种离子分别为氨氧化和后续的硝化过程的产物; 然而作为氨氧化过程的底物, NH_4^+ 的浓度与基因丰度的相关性并不明显, 其原因可能是: 基于目前已获得的氨氧化古菌菌株的生理学研究, 它们都对生长环境中的 NH_4^+ 浓度要求极低 ($\leq 10\text{nmol/L}$)^[1-2], 这使得 NH_4^+ 并不能成为影响氨氧化古菌丰度的限制因子。另外, 其它的环境参数均未发现与古菌 *accA* 和 *amoA* 基因丰度存在统计学意义上的相关性 (R 的绝对值小于 0.38, $P > 0.1$)。

表 6. 古菌 *accA* 和 *amoA* 基因丰度与主要环境因子的相关性分析

Table 6. Statistical correlations (r values) between main environmental factors and archaeal *accA* and *amoA* gene abundances

Factor	<i>accA</i>	<i>amoA</i>
pH	-0.13	-0.14
NH ₄ ⁺	-0.09	-0.09
NO ₂ ⁻	0.69 (P=0.001)	0.70 (P=0.02)
NO ₃ ⁻	0.58 (P=0.001)	0.53 (P=0.019)
Temp	-0.14	-0.14

总之,本次研究表明了云南地区不同热泉中古菌和细菌的丰度及两者比例关系都存在比较明显的差异。古菌 *accA* 与 *amoA* 基因的丰度基本相同,且存在极显著的相关性,这进一步支持了热泉环境下的氨氧化古菌是通过 HP/HB 途径固定 CO₂。此外,这两种基因的丰度和 NO₂⁻ 和 NO₃⁻ 的浓度存在较强关联,然而本次研究并未发现它们与环境 pH 值存在明显统计学意义上的相关性,这与常温土壤环境的相关研究结果存在不同。

参考文献

- [1] Stahl DA, de la Torre JR. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annual Review Microbiology*, 2012, 66: 83-101.
- [2] Hatzepichler R. Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (21): 7501-7510.
- [3] Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6 (3): 245-252.
- [4] Zhang L, He J. A novel archaeal phylum: Thaumarchaeota - A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (4): 411-421. (in Chinese)
张丽梅, 贺纪正. 一个新的古菌类群——奇古菌门 (Thaumarchaeota). *微生物学报*, 2012, 52 (4): 411-421.
- [5] Hallam SJ, Mincer TJ, Schleper C, Preston CM, Roberts K, Richardson PM, DeLong EF. Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS Biology*, 2006, 4 (4): e95.
- [6] Berg IA, Kockelkorn D, Buckel W, Fuchs GA. 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in Archaea. *Science*, 2007, 318 (5857): 1782-1786.
- [7] Berg IA, Kockelkorn D, Ramos-Vera WH, Say RF, Zarzycki J, Hügler M, Alber BE, Fuchs G. Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8 (6): 447-460.
- [8] Moss J, Lane MD. Biotin-dependent enzymes, 1971, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 35: 321-442.
- [9] Yakimov MM, Conoa VL, Denaro RA. First insight into the occurrence and expression of functional *amoA* and *accA* genes of autotrophic and ammonia-oxidizing bathypelagic Crenarchaeota of Tyrrhenian Sea. *Deep Sea Res II*, 2009, 56 (11): 748-754.
- [10] Hu A, Jiao N, Zhang CL. Community structure and function of planktonic Crenarchaeota: changes with depth in the South China Sea. *Microbiology Ecology*, 2011 (3), 62: 549-563.
- [11] Hu A, Jiao N, Zhang R, Yang Z. Niche partitioning of marine group I Crenarchaeota in the euphotic and upper mesopelagic zones of the East China Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011 (21), 77: 7469-7478.
- [12] Pratscher J, Dumont MG, Conrad R. Ammonia oxidation coupled to CO₂ fixation by archaea and bacteria in an agricultural soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 (10): 4170-4175.
- [13] Yakimov MM, Cono VL, Smedile F, DeLuca TH, Juárez S, Ciordia S, Fernández M, Albar JP, Ferrer M, Golyshin PN, Giuliano L. Contribution of crenarchaeal autotrophic ammonia oxidizers to the dark primary production in Tyrrhenian deep waters (Central Mediterranean Sea). *ISME Journal*, 2011, 5 (6): 9459-9461.
- [14] Bergauer K, Sintès E, van Bleijswijk J, Witte H, Herndl GJ. Abundance and distribution of archaeal acetyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase genes indicative for putatively chemoautotrophic Archaea in the tropical Atlantic's interior. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 84 (3): 461-73.
- [15] Reigstad LJ, Richter A, Daims H, Urich T, Schwark L, Schleper C. Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka. *FEMS Microbiology Ecology*,

- 2008, 64 (2) : 167-174.
- [16] Zhao W, Song Z, Jiang H, Li W, Mou X, Christopher SR, Juergen W, Dong H, Zhang CL. Ammonia-oxidizing Archaea in Kamchatka Hot Springs. *Geomicrobiology Journal*, 2011, 28 (2) : 149-159.
- [17] de la Torre JR, Walker CB, Ingalls AE, Konneke M, Stahl DA. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (3) : 810-818.
- [18] Zhang CL, Ye Q, Huang Z, Li W, Chen J, Song Z, Zhao W, Bagwell C, Inskeep WP, Ross C, Gao L, Wiegel J, Romanek CS, Shock EL, Hedlund BP. Global occurrence of archaeal *amoA* genes in terrestrial hot springs. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (20) : 6417-6426.
- [19] Jiang H, Huang Q, Dong H, Wang P, Wang F, Li W, Zhang CL. RNA-based investigation of ammonia-oxidizing archaea in hot springs of Yunnan Province, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (13) : 4538-2541.
- [20] Song ZQ, Wang L, Wang FP, Jiang HC, Chen JQ, Zhou EM, Liang F, Xiao X, Li WJ. Abundance and diversity of archaeal *accA* gene in hot springs in Yunnan Province, China. *Extremophiles*, 2013, 17 (5) : 871-879.
- [21] Nadkarni M, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad range (universal) probe and primer set. *Microbiology*, 2002, 148 : 257-266.
- [22] Lane DJ. 16S/23S rRNA Sequencing // Stackebrandt E, Goodfellow M. eds. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*. New York: John Wiley, 1991 : 115-175.
- [23] Takai K, Horikoshi K. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (11) : 5066-5072.
- [24] 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 : 14683-14688.
- [25] Song Z, Chen J, Jiang HC, Zhou EM, Tang SK, Zhi XY, Zhang L, Zhang CL, Li, W. Diversity of Crenarchaeota in terrestrial hot springs in Tengchong, China. *Extremophiles*, 2010, 14 (3) : 287-96.
- [26] Wang S, Hou W, Dong H, Jiang H, Huang L, Wu G, Zhang C, Song Z, Zhang Y, Ren H, Zhang J, Zhang L. Control of temperature on microbial community structure in hot springs of the Tibetan Plateau. *PLoS One*, 2013, 8 (5) : e62901.
- [27] Song Z, Wang L, Chen J, Zhou E, Zhang C, Li W. Diversity of crenarchaeota in terrestrial hot springs and their surrounding environments in Kamchatka, Russia. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (6) : 469-476. (in Chinese)
- 宋兆齐, 王莉, 陈金全, 周恩民, 张传伦, 李文均. 俄罗斯堪察加地区热泉及其周边生境的泉古菌多样性. *微生物学报*, 2013, 53 (6) : 469-476.
- [28] Spear JR, Walker JJ, McCollom TM. Hydrogen and bioenergetics in the Yellowstone geothermal ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (7) : 2555-2560.
- [29] Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442 (7104) : 806-809.
- [30] Lehtovirta-Morley LE, Stoecker K, Vilcinskas A, Prosser JI, Nicol GW. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 (38) : 15892-15897.
- [31] Gubry-Rangin C, Hai B, Quince C, Engel M, Thomson BC, James P, Schloter M, Griffiths RI, Prosser JI, Nicol GW. Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 (52) : 21206-21211.

Abundances of ammonia-oxidizing archaeal *accA* and *amoA* genes in response to NO_2^- and NO_3^- of hot springs in Yunnan province

Zhaoqi Song^{1,2}, Li Wang¹, Enmin Zhou², Fengping Wang³, Xiang Xiao³, Chuanlun Zhang⁴, Wenjun Li^{2,5*}

¹ Biorefinery Engineering Lab of Henan Province, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, Henan Province, China

² Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China, Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan Province, China

³ State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

⁴ State Key Laboratory of Marine Geology, Tongji University, Shanghai 200092, China

⁵ College of Ecology and Evolution, Sun Yat – Sen University, Guangzhou 510275, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] Yunnan hot springs have highly diverse ammonia-oxidizing archaea (AOA), which are autotrophic and can fix CO_2 using the 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate (HP/HD) pathway. In this study, we investigated the abundances of prokaryotic 16S rRNA gene and archaeal *accA* and *amoA* genes in the sediments of hot springs of Yunnan Province, and analysed the correlations between the above gene abundances and environmental factors. [Methods] We selected the sediments of twenty representative hot springs, and detected the gene abundances by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The principal component analysis (PCA) and the Mantel test in the R software package were performed for the correlations of gene abundance and environmental variables. [Results] The bacterial and archaeal 16S rRNA gene abundances were from 6.6×10^7 to 4.19×10^{11} and from 1.27×10^6 to 1.51×10^{11} copies/g sediment, respectively; Archaeal *accA* and *amoA* genes were from 8.89×10^3 to 6.49×10^5 and from 7.64×10^3 to 4.36×10^5 copies /g sediment, respectively. The results of mantel test showed that *accA* gene was significantly ($R = 0.98$, $P < 0.001$) correlated with *amoA* gene; Both of them also were correlated significantly with NO_2^- and NO_3^- , but not with pH. [Conclusion] The abundances of bacterial and archaeal 16S rRNA genes and the ratio between them varied significantly among Yunnan hot springs. The archaeal *accA* and *amoA* genes showed significant correlation with each other, validating our previous finding that AOA in terrestrial hot springs might acquire energy from ammonia oxidation coupled with CO_2 fixation using the 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate pathway.

Keywords: Yunnan hot springs, prokaryotic abundance, ammonia-oxidizing archaea, gene *accA*, gene *amoA*, qPCR

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of International Cooperation of China Ministry of Science & Technology (MOST) (2013DFA31980), by the National Natural Science Foundation of China (31300430), by the Key Project of Yunnan Provincial Natural Science Foundation (2013FA004) and by the Project of Henan Provincial Basic and Advanced Foundation (132300410201)

* Corresponding author. Tel: +86-871-65033335; E-mail: wjli@ynu.edu.cn, liaact@hotmail.com

Received: 8 April 2014/ Revised: 4 June 2014