

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (3) :351 – 357; 4 March 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140282

奇古菌亚硝酸盐还原酶基因相似基因的多样性

黄晓燕, 罗剑飞, 赵丹丹, 林炜铁*

华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006

摘要:【目的】氨氧化古菌 (Ammonia-oxidizing archaea, AOA) 是奇古菌门中的唯一类群, 广泛分布于各个生态系统中, 对氮素生物地球化学循环起着重要作用。亚硝酸还原酶是反硝化作用的关键酶, 目前关于 AOA 反硝化作用的研究较少, 对 AOA 亚硝酸盐还原酶基因多样性的研究有利于揭示 AOA 在反硝化中的作用。【方法】本研究以水体、沉积物和土壤为研究对象, 构建了奇古菌样的 *nirK* 基因克隆文库, 研究了这些环境中 *nirK* 相似基因的多样性。【结果】对奇古菌样的 *nirK* 基因文库及其序列分析表明: 湖水及其沉积物的 *nirK* 基因克隆文库得到 10 个 OTUs, 菜田土壤和水样则有 8 个 OTUs; 系统发育进化树表明这些 *nirK* 氨基酸序列和 *Candidatus Nitrosopumilus koreensis* AR1, *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 最为相似, 但相似度较低 (53% – 68%)。克隆文库多样性指数分析表明: 所有样品都存在不同类型的 *nirK* 基因, 水体样品 *nirK* 基因类型的多样性和均匀度高于土壤样品, 菜田土壤的 *nirK* 基因类型多样性最高, 分布最均匀。【结论】本研究表明土壤和淡水环境中奇古菌门 *nirK* 基因也具有较高多样性, 并且这些基因型与海洋样品差异非常大, 这些基因编码的亚硝酸盐还原酶可能对这些环境中的反硝化作用有重要意义。

关键词: 氨氧化古菌, 亚硝酸盐还原酶, 多样性, 奇古菌门

中图分类号: Q939 文章编号: 0001-6209 (2015) 03-0351-07

反硝化作用是反硝化微生物在无氧或者微氧的条件下, 以氮氧化物作为末端电子受体, 生成 N_2O 、 NO 和 N_2 的过程^[1]。这是土壤氮损失的一个重要机制也是温室气体 N_2O 和 NO 产生的重要途径, 在氮循环中起着非常重要的作用^[2]。反硝化过程主要的参与酶包括亚硝酸还原酶、硝酸盐还原酶、一氧化氮还原酶、氧化亚氮还原酶^[3-4]。其中由亚硝酸还原酶 (Nitrite reductase, Nir) 催化, 将亚硝酸还原成一氧化氮的反应, 是区分反硝化菌和硝酸盐呼吸菌的关键步骤, 后者不能将硝酸根还原成气体。亚硝

酸还原酶基因作为反硝化菌的分子标记, 最早用于反硝化微生物多样性的研究^[5]。长期以来, 关于氨氧化细菌反硝化的研究有很多。但研究发现奇古菌门中的氨氧化古菌 (AOA) 在不同的水生和陆生环境分布广泛, 可能在地球氮循环中起着非常重要的作用^[6-7]。AOA 的模式菌株 *N. maritimus* SCM1 的相关研究表明: 在低溶氧条件下 AOA 具有很高的 N_2O 产生活力, 而该条件下 AOB 的 N_2O 产生活力很低^[8]。Santoro 等研究 AOA 富集物证明 AOA 在

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21276099, 41301318); 高等学校博士学科点专项基金项目 (20120172120045); 华南理工大学中央高校基本科研业务费 (2013ZB0013)

* 通信作者。Tel: +86-20-39380683; E-mail: weitie@21.cn.com

作者简介: 黄晓燕 (1988 -), 女, 福建省人, 硕士研究生, 研究方向环境微生物学。E-mail: 13794384473@163.com

收稿日期: 2014-05-29; 修回日期: 2014-09-05

氨氧化的过程中也产生 N_2O ^[9]。*nirK* 基因编码亚硝酸盐还原酶。土壤 Thaumarchaeota 文库、环境宏基因组和 AOA 基因组序列中均有发现 AOA 和细菌的 *nirK* 的同源序列,但是两者的相似度仅有 30%^[10-13]。Lund 等研究海洋 *nirK* 基因的多样性和丰度证明了在 AOA 中广泛 *nirK* 广泛^[14]。这些研究表明 AOA 是产生 N_2O 的重要动力,对反硝化作用有重大贡献。本研究主要利用微生物分子生态学方法,探寻了陆地生态系统水环境和土壤环境中奇古菌门 *nirK* 基因的多样性。

1 材料和方法

1.1 样品采集和分析方法

于 2013 年 7 月从广州番禺大学城中心湖采集水样和沉积泥,采样点为靠近湖岸 1 m 左右的位置,水位约深 1 m,采集水样以及表层 3 cm - 10 cm 的沉积泥。在广州珠江穗石渡口附近的穗石村中取得菜园土壤及其水样,土壤取样深度为 3 cm - 10 cm,水深约 5 cm - 10 cm。每个样品采集同一深度的 3 处混合均匀。泥样处理:称取采集的泥样 8 g 加入 TENP50 mL 和少量的石英珠 200 r/min 震荡 1.5 h,再用 TENP 洗涤直至上清液变澄清。水样处理:富集 4 L 采集的水样,5730 × g 10 min 离心,获取沉淀物。提取处理样品的基因组,提取方法参照 CTAB 法^[15]。

1.2 *nirK* 基因扩增

nirK 的 PCR 扩增以 AnirKa-58F (5'-ACB YTA TTC GGA AGY ACA TAC ACA-3') 作为正向引物, AnirKb-555R (5'-ACG TGT TGG TCC ATT GCT GC-3') 作为反向引物^[14]。PCR 程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s, 58 - 48℃ 退火 30 s, 每个循环降低 0.5℃, 72℃ 延伸 1 min, 19 个循环;再以 48℃ 退火增加 9 个循环, 72℃ 延伸 10 min;PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物片断大小。

1.3 *nirK* 基因克隆文库建立与限制性酶切片段多态性 (RFLP) 分析

GenClean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (上海,捷瑞) 回收目的条带,并用 pMD19-T 载体 (TaKaRa, 大连) 连接目的片断,再转入 *E. coli* DH-5α 中, 37℃ 培养 12 h 后挑选白色克隆子,用 pMD19-T 载体的特异性引物 RV-M 和 M1347 进行

菌落 PCR。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测片段大小。

利用限制性内切酶 *Hae* III 和 *Mbo*I 双酶切菌落 PCR 扩增产物,酶切总体积 10 μL, 37℃ 水浴 90 min,酶切产物用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 200 V, 1 h。对限制性酶切片段进行归类,主条带相同的样品归为一类,每种类型样品均送一个测序 (上海生物工程公司)。核苷酸序列相似度大于 98% 的序列归为一个操作分类单元 (OTU)。

1.4 系统发育树分析

利用 NCBI BLASTX 对 *nirK* 序列进行分析,选择相似度最高的序列和目的序列利用软件 MEGA6.0 中的邻接法 (Neighbor-Joining) 建立 *nirK* 基因的系统发育树,并以变形菌纲 (Proteobacteria) 和广古菌门 (Euryarchaeota) 的典型菌属作为外群,进行系统发育分析。Bootstrap values 设置为 1000。

1.5 基因克隆文库的多样性指数分析

丰富度 d 表示物种类型的丰富度, $d = (K-1) / \ln N$ (K : *nirK* 酶切产生的总类型数, N : 酶切克隆总数; 香农-威纳指数 H 表示生境中群落多样性, $H = - \sum_{i=1}^n P_i * \ln P_i$ (P_i : 第 i 种酶切类型出现的频率, $P_i = N_i / N$, N_i 为第 i 种酶切类型所包含的克隆数; 均匀度 E 表示同个生境中不同微生物分布数量的差异度, $E = H / H_{\max}$ (H_{\max} 为最大多样性, $H_{\max} = \ln S$, S 为不同 OTU 的总类数; 克隆覆盖指数, 用公式 $C = 1 - n / N$ 分析, 其中 n 为仅在文库中出现一次的 OTUs 数量, N 为一个克隆文库中总的克隆子数^[16-19]。

2 结果和分析

2.1 *nirK* 基因 PCR 结果

水样和土样共 4 个样品都能扩增出 *nirK* 基因, *nirK* 基因的片段大小 490 bp, 不同样品扩增片段大小亮度基本相同。

2.2 *nirK* 基因的片段多样性分析

2.2.1 *nirK* 基因文库克隆子分布: 每个基因文库的白色克隆子数量 500 - 600 个。每个文库随机挑选 80 - 120 个白色克隆子进行菌落 PCR 和 *Hae* III、*Mbo*I 双酶切, 根据主要条带的差异分出各个文库的酶切类型, 4 个样品共 18 个 OTUs, 其中 9 个 OTUs 克隆子数量有 5 个以上, 数量上占有明显的优势, 不同文库中单次出现的克隆子数仅有 1 - 2 个, 可见优

势的 OTUs 基本已经在文库中显示出来, 文库的分析强度可以用来检测克隆子丰富的 OTUs (图 1)。从图中可以看出菜田泥样 SN 和菜田水样 SS 有 6 个共同的 OTUs, 两者共同的 OTUs 占了 46%; 湖水泥样 ZN 和 ZS 有 7 个共同的 OTUs, 共同 OTUs 占了

70%, 并且 ZN 的 OTUs 都包含在 ZS 样品中。两种样品水样的 *nirK* 基因类型丰富度高于泥样, 并且相似度较高。旱田样品总 *nirK* 基因可分为 12 个 OTUs, 湖水样品则为 10 个 OTUs, 菜田样品 *nirK* 基因类型更丰富。

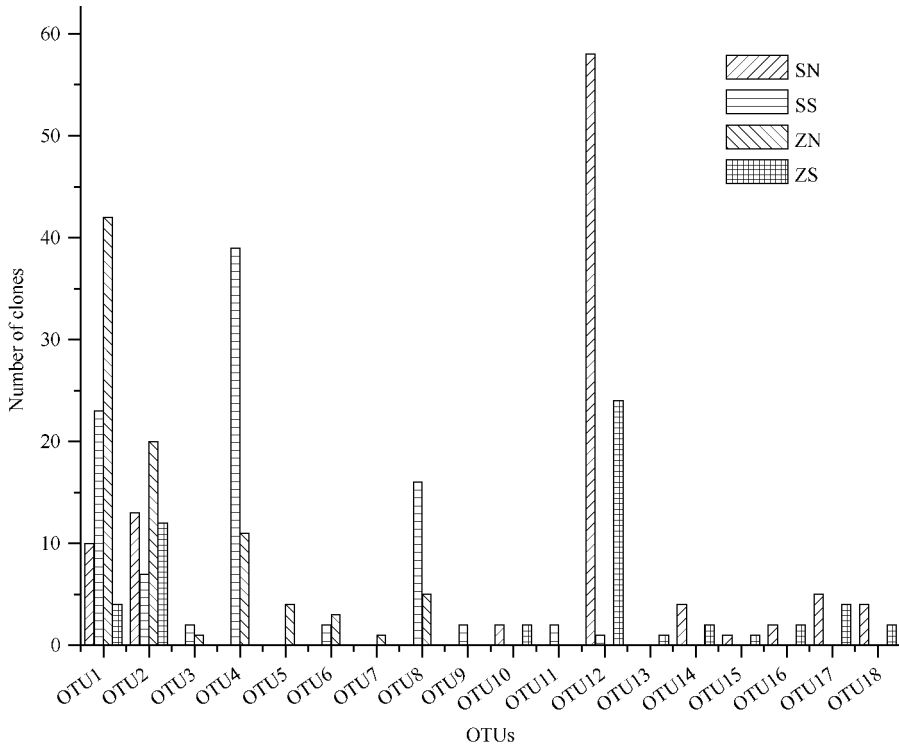


图 1. 文库中每个 OTU 的分布丰度

Figure 1. Abundance of each OTU in clone library.

2.2.2 克隆文库分析: 从表 1 可知, 4 个克隆文库中, 文库丰富度最高的是菜田水样 SS, 最低的是菜田土壤样品 SN。且后者克隆覆盖指数是 1, 说明该文库基本覆盖了样品中不同类型的 *nirK* 基因。其他 3 个文库虽有单次克隆子出现, 但是克隆文库覆盖率均大于 97%, 文库覆盖率高, 克隆文库基本可以代表样品的种群类型。SS 的香农-威纳指数最

高, 均匀度指数也最高, 微生物多样性高, 物种分布最均匀。SN 的香农-威纳指数指数最小, 此处的物种多样性更低, 均匀度也最低。菜田水样物种比土样的更为丰富, 分布更均匀。而湖水样品和沉积泥的物种分布则没有明显的区别, 湖水样多样性略高, 均匀度稍高。

表 1. 各克隆文库 *nirK* 基因多样性分析

Table 1. Diversity indices of the *nirK* gene clone libraries

Clone library	Restriction type	OTUs	Richness	Shannon-Wiener index H	Evenness E	Coverage index C
SN	14	9	2.83	1.92	0.477	1
SS	21	10	4.40	2.78	0.759	0.989
ZN	18	8	3.77	2.22	0.741	0.977
ZS	15	10	3.51	2.36	0.753	0.982

ZN sample from center lake's sediments, ZS sample from center lake's water, SN sample from vegetables' soil in Suishi, SS sample from water near vegetables' soil in Suishi.

2.3 系统发育树分析补充

样品序列 NCBI BLASTX 的比对结果最相近序列的相似度较低,与 *Candidatus Nitrosopumilus koreensis* AR1 和 *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 相似度最高,但也仅有 56% - 68%。文库中提交的 *nirK* 基因序列号为 (KJ689424-KJ689441)。*nirK* 基因序列系统进化发育树分析如图 2 所示,所有 OTUs 的序列均与未培养奇古菌门聚为一个簇,而与外类群广古菌门 (Euryarchaeota) 和变形菌 (Proteobacteria) 的进化距离很远。

NCBI BLASTX 比对分析 (图 3) 显示扩增序列编码的蛋白质为亚硝酸还原酶 (Nitrite reductase), 扩增序列为 *nirK* 基因的保守区,该酶属于铜氧还蛋白家族 (Cupredoxin superfamily)。亚硝酸还原酶为单条肽链,分子质量 63 kDa。其辅基包括一个血红素和一个 4Fe-4S 簇。亚硝酸还原酶的催化反应以铁氧还蛋白为电子供体,6 个电子依次由亚硝酸还原酶的 4Fe-4S 簇和血红素被转移到底物亚硝酸,使后者被还原为铵离子。奇古菌可能通过 *nirK* 基因编码亚硝酸还原酶来利用亚硝酸盐,进行反硝化作用。

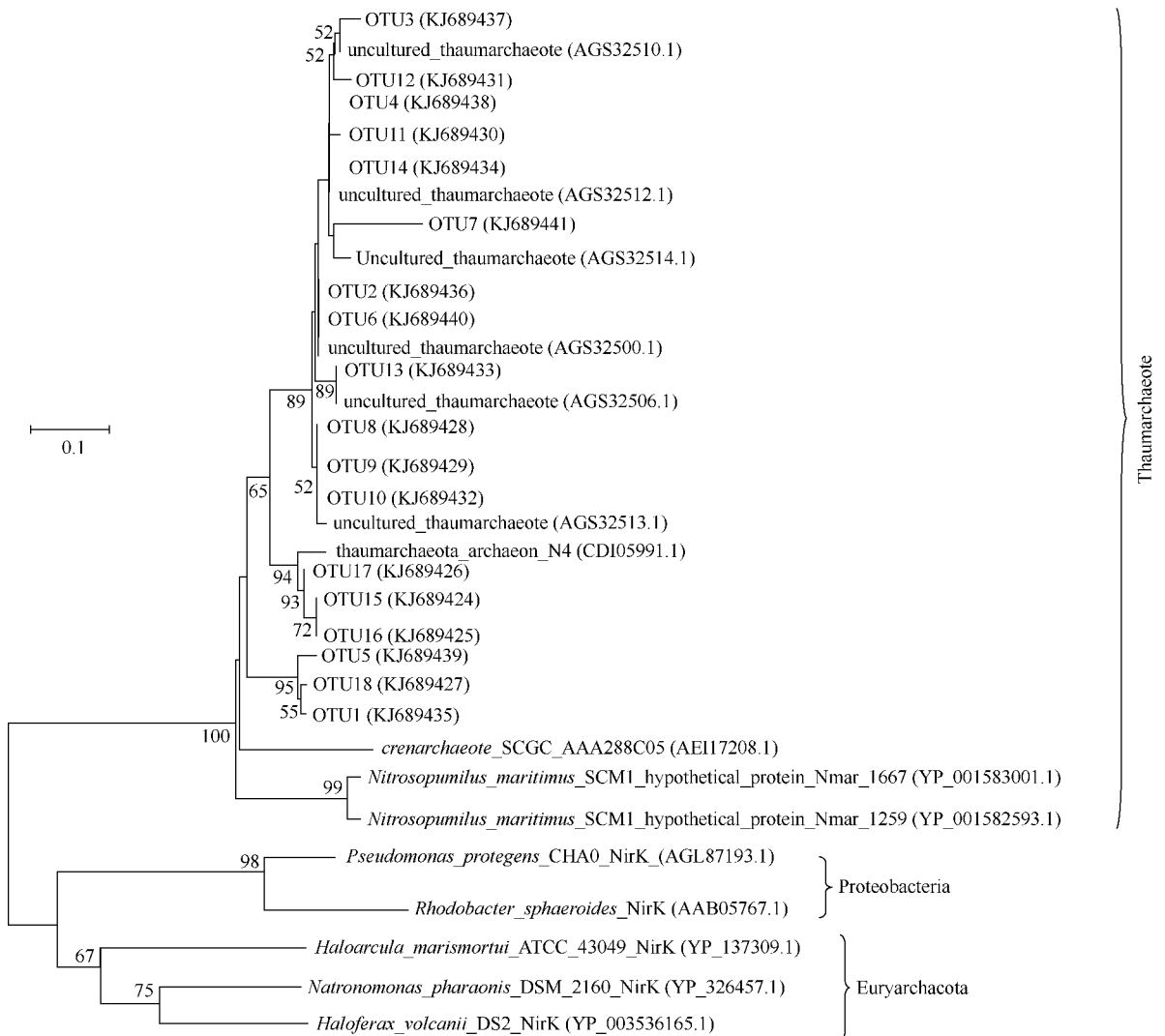


图 2. 奇古菌 *nirK* 基因系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree generated from *nirK* gene. Number in parentheses means sequence number from NCBI means 10% changes are observed between two sequences. Number on horizontal line means evolutionary distance between sequences on the branch.

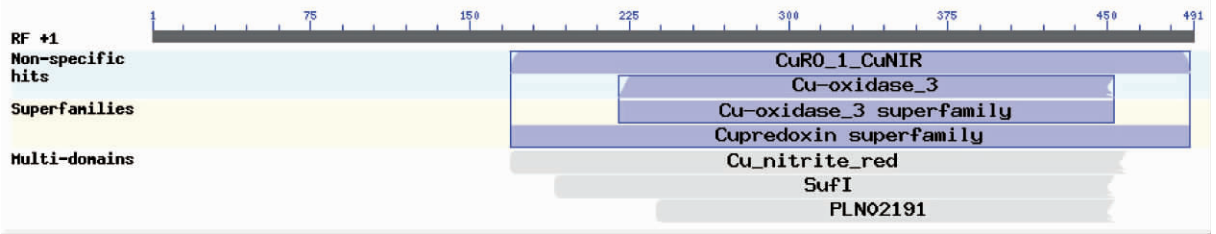


图 3. NCBI BLASTX 比对结果

Figure 3. Result of NCBI BLASTX.

3 讨论

本文以 *nirK* 基因作为奇古菌的标记基因, 采用奇古菌的专性引物来扩增淡水湖湖水及其沉积泥和菜田泥及其周边水的 *nirK* 基因, 研究采样点产 *nirK* 基因的奇古菌类群与丰度。4 个采样点均有较为丰富的 *nirK* 基因, 证明在淡水湖中和菜田样品中存在奇古菌, 并且两处水样的奇古菌类群种类都比土样丰富, 均匀度也更高。菜田样品则比中心湖湖水奇古菌类群分布更为均匀。这说明在不同的环境中存在的 *nirK* 基因类群的丰富度、均匀度是不相同的。

在已有的研究中, 已知的所有 AOA 均属于奇古菌门, 其中来自于温泉的 *N. yellowstonii* 归为 Group III; 来自海洋环境中和田田根际土壤的 *N. koreensis* 归为 Group1. 1a; Group1. 1a-associated 类群中包括 *Candidatus N. devanaterre*; *N. gargensi* 和来自于土壤的 *N. viennensis* 归为 Group1. 1b。通过 RFLP 技术分型归类, 代表克隆子测序, 序列比对构建系统发育树, 系统发育树显示所有样品系列都属于奇古菌门。但是 4 个不同的采样点克隆的 *nirK* 基因与 NCBI 中提交的已知菌序列和未培养菌序列的相似度都较低 (56% - 68%)。4 个文库中的 *nirK* 基因的谱系分散, 氨基酸序列一致性比较低, 克隆文库中的 *nirK* 基因类型与已经提交的其他 *nirK* 基因差异大。进化发育树分析发现与样品序列最为相似的是来自海洋的 *Nitrosopumilus maritimus*_SCM1, 但是它们的相似度很低, 分布在了不同的簇。在这些陆地淡水和土壤中采集的样品的 *nirK* 在 NCBI 数据库中最为相似的未培养菌序列来自于珠江样品。这可能是同为淡水环境, *nirK* 基因型更为相似。而海洋环境与淡水环境的盐度差别很大, 可能导致了奇古菌 *nirK* 基因差异甚大。本文中 *nirK* 基因扩增的引物是以

AnirKa 的前端引物和 AnirKb 的末端引物组合扩增出的片段, 有可能这些奇古菌编码的 *nirK* 基因是不同于 AnirKa 和 AnirKb 的其他基因型。而测序结果显示序列与提交的序列相似度低也证实了这个结论, 这说明在不同的环境下还有其他类群的奇古菌, 奇古菌的种类非常丰富。

参考文献

- [1] Schreiber F, Wunderlin P, Udert KM, Wells GF. Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: biological pathways, chemical reactions, and novel technologies. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 1-24.
- [2] Spanning RJ, Delgado MJ, Richardson DJ. Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment. New York: Springer-Verlag New York Inc, 2005.
- [3] Kandeler E, Deiglmayr K, Tschirko D. Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (9): 5957-5962.
- [4] Weng B, Xie X, Yang J, Liu J, Lu H, Yan C. Research on the nitrogen cycle in rhizosphere of *kandelia obovata* under ammonium and nitrate addition. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 76: 227-240.
- [5] Guo L, Shi F, Yang L. Advance in gene function and molecular ecology of denitrifying bacteria. *Microbiology China*, 2011, 384 (4): 583-590. (in Chinese)
郭丽芸, 时飞, 杨柳燕. 反硝化菌功能基因及其分子生态学研究进展. 微生物学通报, 2011, 384 (4): 583-590.
- [6] Luo J, Lin W. Advance of ammonia-oxidizing archaea. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 2013, 41 (12): 107-133. (in Chinese)

罗剑飞, 林炜铁. 氨氧化古菌研究进展. 华南理工大学学报(自然科学版), 2013, 41(12): 107-133.

- [7] Jia Z, Wen J, Lin X, Conrad R. Advance in ecology of ammonia-oxidizing archaea. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 50(4): 431-437. (in Chinese).
- 贾仲君, 翁佳华, 林先贵, Conrad R, 氨氧化古菌的生态学研究进展. 微生物学报, 2009, 50(4): 431-437.
- [8] Löscher CR, Kock A, Könneke M, LaRoche J, Bange HW, Schmitz RA. Production of oceanic nitrous oxide by ammonia-oxidizing archaea. *Biogeosciences*, 2010, 9(7): 2419-2429.
- [9] Santoro AE, Buchwald C, McIlvin MR, Casciotti KL. Isotopic signature of N₂O produced by marine ammonia-oxidizing archaea. *Science*, 2011, 333(6047): 1282-1285.
- [10] Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, Klenk HP, Schleper C. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(12): 1985-1995.
- [11] Hollibaugh JT, Gifford S, Sharma S, Bano N, Moran MA. Metatranscriptomic analysis of ammonia-oxidizing organisms in an estuarine bacterioplankton assemblage. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 2011, 5(5): 866-878.
- [12] Walker CB, de la Torre JR, Klotz MG, Urakawa H, Pinel N, Arp DJ, Brochier-Armanet C, Chain PS, Chan PP, Gollabgir A, Hemp J, Hügler M, Karr EA, Könneke M, Shin M, Lawton TJ, Lowe T, Martens-Habbena W, Sayavedra-Soto LA, Lang D, Sievert SM, Rosenzweig AC, Manning G, Stahl DA. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(19): 8818-8823.
- [13] Blainey PC, Mosier AC, Potanina A, Francis CA, Quake SR. Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis. *PLoS One*, 2011, 6(2): 1-12.
- [14] Lund MB, Smith JM and Francis CA. Diversity, abundance and expression of nitrite reductase (*nirK*)-like genes in marine thaumarchaea. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 2012, 6(10): 1966-1977.
- [15] Song P, Ma L. Application of TENP-PBS pretreatment in the DNA extraction of soil. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(24): 12987-12980. (in Chinese)
- 宋培勇, 马莉莉. TENP-PBS 预处理在提取土壤 DNA 中的应用. 安徽农业科学, 2010, 38(24): 12987-12980.
- [16] Chao A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*, 1987, 43(4): 783-791.
- [17] Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BJ. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(10): 4399-4406.
- [18] Xu Q, Zhang F, Xu Z, Jia Y, You J. Analysis and dilution effect of certain features of Simpson index and Shannon-Wiener index. *Pratacultural Science*, 2011, 28(4): 527-531. (in Chinese)
- 许晴, 张放, 许中旗, 贾彦龙, 尤建民. Simpson 指数和 Shannon-Wiener 指数若干特征的分析及“稀释效应”. 草业科学, 2011, 28(4): 527-531.
- [19] Stres B, Mahne I, Avgustin G, Tiedje JM. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene fragments differ between native and cultivated michigan soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 301-309.

Diversity of thaumarchaeal nitrite reductase (*nirK*)-like genes in environments

Xiaoyan Huang, Jianfei Luo, Dandan Zhao, Weitie Lin*

School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] Nitrite reductase encoded by *nirK* is a key enzyme to denitrification, and is found in ammonia-oxidizing archaea (AOA). Based on the diversity of *nirK*, it was good to study the functions of nitrite reductase to AOA on denitrification. [Methods] We constructed *nirK* gene clone libraries based on the *nirK* gene PCR products of water, sediment and soil, screened the positive clones by restriction fragment length polymorphism (RFLP), and sequenced the representative fragments from positive clones. [Results] RFLP analysis of the clone libraries shows that there were 10 OTUs in fresh water and sediment, 8 in vegetable soil and its nearby water. Phylogenetic analysis indicated that the amino acid sequences of these *nirK* were most closely related to the Candidatus *Nitrosopumilus koreensis* AR1 and *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 with similarities ranging from 53% to 68%. Diversity index of clone libraries shows there were many different types of *nirK* genes in all samples. Diversity and evenness index of *nirK* gene of water samples was higher than soil samples whereas vegetable field samples were the richest. [Conclusion] Thaumarchaeote *nirK* gene had high diversity in soil and freshwater environments which were very different from ocean sample. The *nirK* gene encoding nitrite reductase might be important for thaumarchaeote denitrification.

Keywords: ammonia-oxidizing archaea, nitrite reductase, diversity, thaumarchaeote

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21276099, 41301318), by the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20120172120045) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2013ZB0013)

* Corresponding author. Tel: +86-20-39380683; E-mail: weitie@scut.cn

Received: 29 May 2014/Revised: 5 September 2014