



氮依赖型甲烷厌氧氧化菌的整合

江丽珍^{1#}, 刘江^{2#}, 向兴³, 刘仁菊², 王锐诚³, 龚林锋^{1*}

¹ 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005

² 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211

³ 中国地质大学(武汉)生物地质与环境地质国家重点实验室, 湖北 武汉 430074

摘要: 氮依赖型甲烷厌氧氧化菌(nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria, n-damo 细菌, 属于 NC10 门)是最近 10 年来微生物生态学领域的研究热点。然而, 对该类群基于现有数据的生态分布、群落结构和系统进化的整合分析还未见报道。【目的】为了更好地将近年来针对该类群的研究做一次全面梳理, 本文通过整合前人已有发表数据和结合自身实验数据两方面进行。【方法】一方面, 利用 NCBI 数据库(数据搜集到 2016 年 11 月)中所有 n-damo 细菌序列对其进行生物信息学分析; 另一方面, 对大九湖泥炭地表层泥炭利用 16S rRNA 二代测序技术对该类群进行检测, 并同前人数据进行对比。【结果】n-damo 细菌主要在沉积物、湿地和水稻土检出; 基于 *pmoA* 基因的 n-damo 细菌的平均检出率是基于 16S rRNA 基因检出率的 7 倍, 但是这两类基因分子标记物所得到的多样性指数保持相对稳定(1.4–3.4); 贫氮的大九湖泥炭其 NC10 的丰度仅为 0.067%。【结论】n-damo 类群种群相对稳定, 暗示其行使的生态功能相对单一; 贫氮的大九湖泥炭其极低的 NC10 丰度暗示氮对 NC10 是限制因子; 具有真正氮依赖型甲烷厌氧氧化细菌的 Group A 可能只占很少的一部分(小于 20%), 暗示出该类群真正的生态潜能需要进一步评估。本次整合分析为更好的理解 n-damo 细菌的生活环境、评估不同基因分子标记物下 n-damo 细菌的检出率、不同亚类群比如 Group A 和 Group B 等的丰度和真正的潜在生态功能提供参考。

关键词: 氮依赖型甲烷厌氧氧化菌, 整合分析, 群落结构, 系统发育分析

甲烷作为一种重要的能源, 与人类的生产生活息息相关。然而, 甲烷又是地球大气温室效应的“罪魁祸首”之一, 其温室效应率是等摩尔 CO₂

的 25 倍^[1]。自然界中存在着多种不同生态类型, 例如海洋、湖泊以及泥炭等, 对大气甲烷浓度具有重要的影响。其中, 微生物介导的甲烷代谢在

基金项目: 国家海洋局第三海洋研究所基本科研项目(海三科 2015018)

*通信作者。Tel: +86-592-2195291; E-mail: gonglinfeng@tio.org.cn

#共同第一作者

收稿日期: 2017-09-15; 修回日期: 2018-01-03; 网络出版日期: 2018-01-16

全球甲烷循环中具有十分重要的地位。而嗜甲烷微生物在甲烷释放到大气的过程中可以对其淋滤,从而缓解不同生态系统中甲烷的释放。

自然界中存在两种典型的甲烷氧化作用,即好氧甲烷氧化和厌氧甲烷氧化。海洋环境中以厌氧甲烷氧化为主,在海洋温室气体甲烷减排中发挥了重要作用,该反应可氧化高达 90%的甲烷气体,使得甲烷在进入大气圈之前即被消耗^[2]。好氧甲烷氧化被认为是陆地环境如湿地生态系统中甲烷氧化的主要途径,该过程可氧化湿地土壤所产生的 50%以上的甲烷量^[3]。根据最终电子受体的不同,好氧甲烷氧化又可细化为氧依赖型好氧甲烷氧化(methanotrophs)和亚硝酸盐依赖型甲烷好氧氧化(nitrite-depend aerobic methane oxidation, n-damo)。其中,n-damo 在陆地甲烷氧化过程中扮演着重要的角色,对陆地甲烷释放通量具有显著影响,Hu 等发现 n-damo 过程对湿地甲烷的消耗量可达到 2%–6%^[4]。

n-damo 隶属于细菌域 NC10 门,暂且归属于 *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* (*M. oxyfera*) 属^[5]。细胞形态呈现多角形,长度为 0.8–1.1 μm,属于革兰氏阴性菌。*M. oxyfera* 细菌生长缓慢,细胞代时约为 1–2 周。*M. oxyfera* 细菌可以将甲烷氧化与亚硝酸盐还原相耦合,从而进行能量代谢。首先将亚硝酸盐还原为 NO,通过歧化反应产生 O₂ 和 N₂,一部分 O₂ 参与了甲烷单加氧酶(pMMO)和一系列脱氢酶催化的甲烷氧化过程,另一部分 O₂ 加入呼吸链参与细胞正常的呼吸。虽然氧气是 n-damo 甲烷氧化的直接电子受体,但其甲烷的氧化需要亚硝酸盐作为底物。此外,温度和 O₂ 浓度都会影响 n-damo 的甲烷氧化功能。

除了利用传统方法对微生物菌群进行富集^[6–9],当前对 n-damo 的研究还包括对该类微生物功能群

的生态分布^[10–18]、微生物与环境的互作^[14,19]以及工艺化应用^[7,20],所使用的手段包括克隆文库^[15]和二代测序分析^[16]、荧光原位杂交(FISH)检测分析^[6]、脂类化合物分析^[21]、同位素分析等^[22–23]。例如,通过克隆文库方法 Deutzmann 等(2014)在深水湖泊 Constance 湖中发现了 n-damo 的存在,并推测其偏好于大型的深水湖泊^[24]。有意思的是,朱群等发现浅水湖泊中 n-damo 微生物类群也具有较高的生物多样性^[25]。

利用基因分子标记物来研究 n-damo 类群是当前研究其生态分布的最为重要的手段之一,其中基于 16S rRNA 和 *pmoA* (编码甲烷单加氧酶 α 亚基)基因的研究最为常见。近十多年来,国内学者也开始关注甲烷厌氧氧化微生物功能群及其参与的生物地球化学过程,一些研究组已经从多个方面对其进行了综述^[26–29]。*pmoA* 基因是编码好氧氧化甲烷的第一步关键酶基因,前人在 n-damo 类群中发现其具有同好氧甲烷菌类似的 *pmo* 基因,为此,通过改良针对好氧甲烷氧化菌的 *pmoA* 引物和引入巢式 PCR 等方法从环境样品中获得该类群的 *pmoA* 序列信息,为更好地研究 n-damo 类群提供了重要指导^[30]。针对甲烷氧化菌的分子标记物检测方法,周京勇等(2015)^[31]已经做了很多的综述,这里不再赘述。前人研究通过 16S rRNA^[11–12]和 *pmoA* 基因的系统发育分析同 *M. Oxyfera* 的相似性将现有发现的 n-damo 微生物划分为 4 个类群: Group A (相似性 94%,包含 *M. Oxyfera*)、Group B (相似性在 90%–93%之间)、Group C 和 Group D (相似性差异变化较大)^[32]。同时,针对 n-damo 细菌的研究综述将前人的文献数据进行整合和对比^[14–15],为我们深入了解 n-damo 细菌提供很好的材料。

前人的研究成果清晰刻画了 n-damo 细菌的多样性以及生态分布。然而,关于 n-damo 细菌分离

环境、群落结构以及系统进化发育的整合分析仍然相对薄弱。本次研究将通过整合 NCBI 数据和实验数据, 进而对 n-damo 细菌群落结构以及进化发育关系进行探究, 以期更好地研究环境中 n-damo 细菌群落的分布模式、结构特征以及与环境的方式。

1 材料和方法

1.1 数据获取

本次研究数据主要包括三部分: 一部分是基于 NCBI 数据库获得, 一部分是从已经发表的文献中获得, 第三部分 n-damo 细菌的分析数据从湖北神农架大九湖表层泥炭样品的 16S rRNA 扩增子测序中获得。

1.1.1 基于 NCBI 数据库获得: 直接从 NCBI 调出所有 n-damo 细菌的序列, 包括 16S rRNA 和 *pmoA* 基因序列。具体方法如下: 在 NCBI 提交的 n-damo 细菌序列通过检索关键字“16S of NC10”或者“*pmoA* of NC10”下载获得, 一共获得 n-damo 细菌 16S rRNA 序列 2513 条, 通过 RDP pipeline (<http://rdp.cme.msu.edu/pipeline>) 去除嵌合体一共获得过滤序列 2319 条, 平均长度 440 bp; 获得 n-damo 细菌 *pmoA* 基因序列 2780 条, 通过 RDP FunGenepipeline (<http://fungene.cme.msu.edu/FunGenePipeline/>) 进行嵌合体检测一共获得过滤之后的序列 2581 条, 平均长度 389 bp (比对之后掐头去尾所得氨基酸长度为 87 aa)。

1.1.2 文献中获取: 将基于二代测序的数据 16S rRNA (两组数据, 原始数据未能找到) 和 *pmoA* 基因 (两组原始数据) 从 NCBI SRA 进行下载。依据已发表文献统计其群落结构组成和相对丰度信息, 通过 RDP FunGenepipeline 将分属于 NC10 phylum

的序列(*pmoA* 基因)提取进行后续系统发育树分析。

1.1.3 16S rRNA 扩增子测序: 为了验证 NC10 在泥炭地的检出率和代表性 OTU (operational taxonomic units, 操作分类单元) 数目、多样性指数、覆盖度同已有发表数据之间的对比, 将取自湖北神农架大九湖泥炭地的 9 个泥炭表层样品 (2014 年 8 月采集) 提取 DNA 之后利用细菌 16S rRNA V4 区通用引物 520F (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3') 和 802R (5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3') 进行 Miseq 二代测序分析, 利用 QIIME 1.9.0 将同属于 NC10 的序列提取出来, 最终一共获得 148 条 reads, 平均长度 240 bp。

1.2 NC10 phylum 的 OTU 划分及其发育树分析

利用 RDP 分析中的 pipeline 提取 NC10 中代表性的 OTU (16S rRNA 和 *pmoA* 分别用 0.03 和 0.05 进行 OTU/cluster 划分) 和丰度信息, 之后以 Candidatus *M. oxyfera* (FP565575.1) 与疣微菌门等类群的 16S rRNA 和 *pmoA* 基因序列分别加入作为参考序列, 利用 MEGA 6.0 软件进行系统发育树分析。

1.2.1 NC10 phylum 序列的环境信息获取: 以 KP743861.1 为例, 在 Linux 系统终端, 将通过嵌合体过滤的所有序列 (16S rRNA 和 *pmoA*) 依据 ID 号通过 wget 和 sed 命令调取该序列的分离环境信息 (isolation_resource)。用 cat 命令将所有序列环境信息合并, 用 excel 将分离环境信息和所包含的序列数目进行统计。

1.2.2 二代测序来源的 *pmoA* 基因序列分析 (依据前人参考文献, 截止到 2016 年 11 月): 把 NCBI SRA 数据库检索到的两组 n-damo 的数据 (454 测序平台, *pmoA* 基因, 具体请参见表 1), 使用 RDP FunGenepipeline 过滤掉长度小于 80 个氨基酸、百

分比 cutoff 值 0.4、聚类距离 cutoff 值 0.05 的序列，随后将剩下的序列进行 OTU 划分。依据 Bioedit (version 7.0.0) 软件，将代表性 OTU 序列同 Candidatus *M. oxyfera pmoA* 基因通过做本地化比对，提取同 Candidatus *M. oxyfera pmoA* 基因序列相似性大于 94% 的序列用 MEGA 6.0^[33] 进行系统发育树构建，相似性小于 94% 的序列定义为 methane oxidation bacteria (MOB)，为非 n-damo 细菌类群，在本文中不做探讨。

1.2.3 二代测序来源的 16S rRNA 基因分析：对于大九湖泥炭获得的 16S rRNA 序列，先用 QIIME 1.9.0 提取所有属于 NC10 门类的 reads 序列信息，利用 mothur 软件的 dist.seqs、cluster、bin.seqs 和 get.oturep 等命令获得代表性 OTU，利用 collect.single 命令获得多样性指数；同时连同 NCBI 数据库获得 NC10 门的 16S rRNA 代表性 OTU 进行系统发育分析。

2 结果和分析

2.1 n-damo 细菌基因序列记录的环境信息统计

16S rRNA 和 *pmoA* 基因都显示 n-damo 细菌主要来自沉积物环境(图 1)，分别占总序列数目的 64.4% (1438 条)和 65.0% (1667 条)。此外，消落带土壤、水稻田土以及湿地生态系统也具有相对较高的丰度。然而，培养物与泥炭来源的序列则相对较少。

2.2 n-damo 类群代表性 OTU 的划分阈值

将 n-damo 类群的 *pmoA* 和 16S rRNA 基因序列通过 RDP pipeline 聚类分析之后依据序列相似性阈值和 cluster (等同于 OTU) 数目进行二维投点(图 2)。当 16S rRNA 基因的阈值为 0.03 时，*pmoA* 基因用于区分 cluster (16S rRNA 划分的 cluster

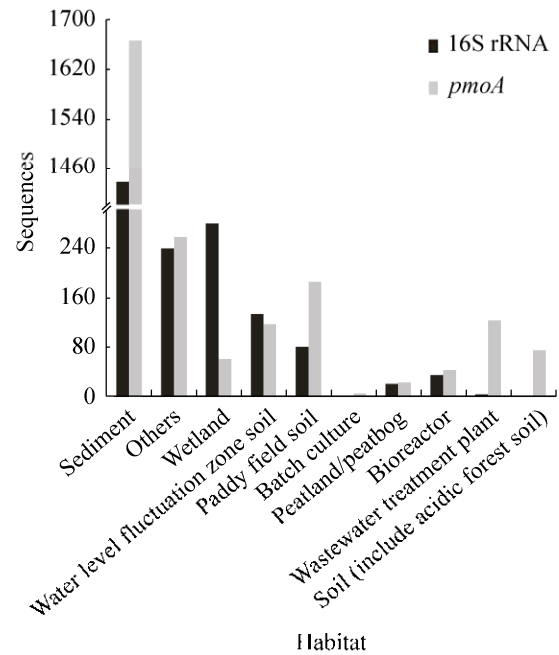


图 1. n-damo 细菌 NCBI 记录的 16S rRNA 和 *pmoA* 序列分离来源统计

Figure 1. Statistic of isolation resource of n-damo bacteria from NCBI based on 16S rRNA and *pmoA* gene.

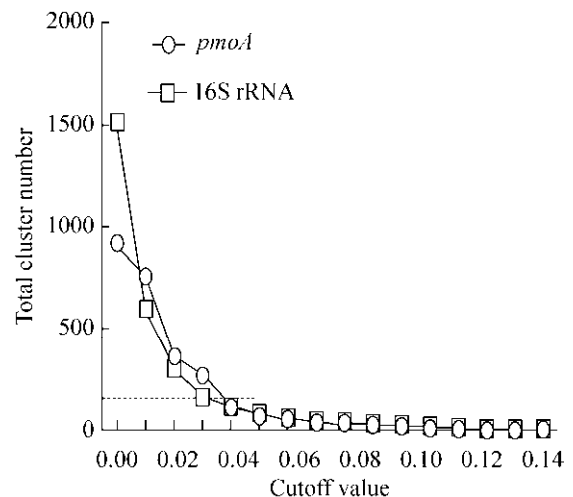


图 2. n-damo 细菌 *pmoA* 和 16S rRNA 的 RDP 聚类结果依据划分距离和总聚类数目进行投点

Figure 2. RDP cluster results of n-damo bacteria based on *pmoA* and 16S rRNA gene along with different cutoff value.

数目)的最小阈值为 0.04 或者 0.05。为了匹配前人一般将 0.05 作为经典的功能基因 OTU 的划分阈值, 后续的 *pmoA* 基因 cluster 的划分均依据 0.05 作为 OTU 的划分阈值。

依据 RDP pipeline 一共获得 n-damo 细菌的代表性 OTU (cluster)分别为 176 个(16S rRNA 基因, 0.03 的阈值)和 79 个(*pmoA* 基因, 0.05 阈值)。将 *M. oxyfera* 与疣微菌门等类群的 16S rRNA 和 *pmoA* 基因序列分别作为参考序列进行了系统发育树分析(图 3 和图 4)。

依据 16S rRNA 系统发育树(图 3), 可将 n-damo 细菌分为 4 个类群, 其中包含 *M. oxyfera* 的 group A 一共含有 3 个 OTU(5 条序列) 而 group B 包含 128 个 OTU (2232 条序列)。在大九湖泥炭地中发现了 148 条序列(8 个 OTU) 均隶属于 group B, 包含 8 个 OTU。

基于 *pmoA* 基因构建的系统发育树显示(图 4), 属于 *M. oxyfera* 一共包含 7 个 OTU (233 条序列), 而可能属于 *M. oxyfera*-like 分为两支(group B 和 group C/D), 共计 63 个 OTU(2341 条序列)。

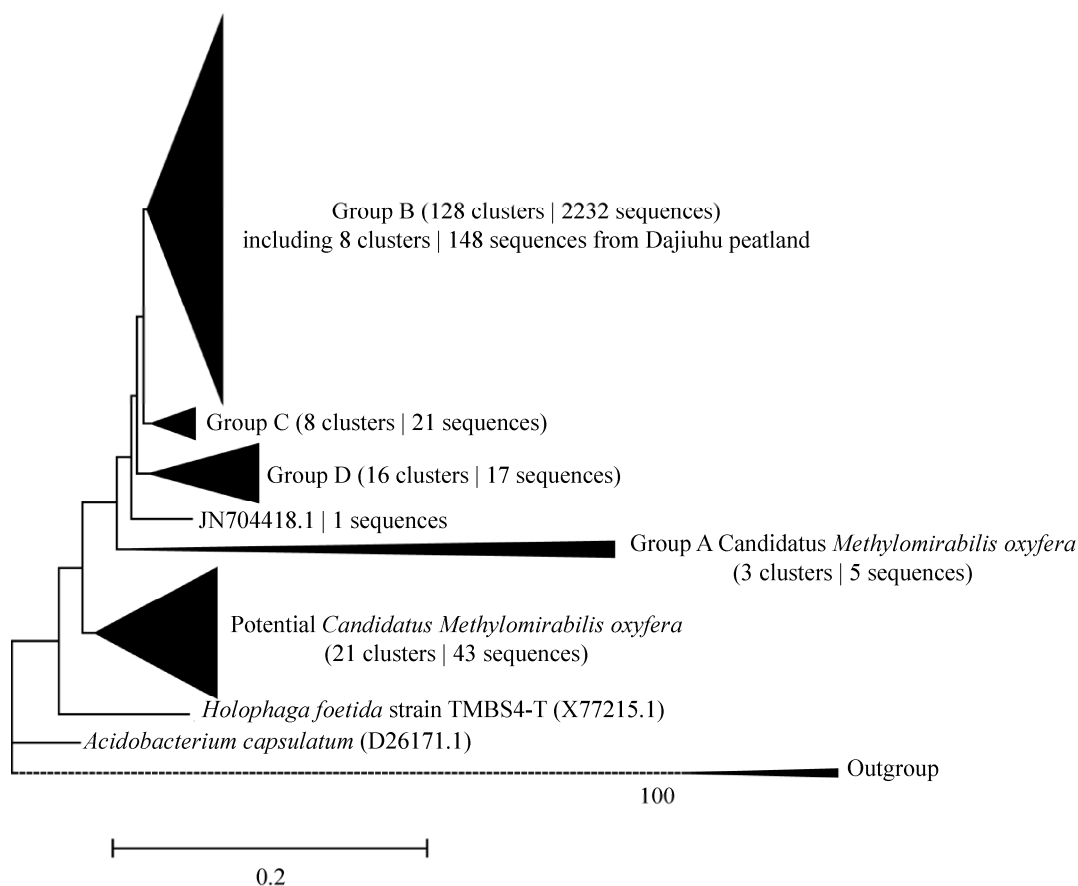


图 3. n-damo 细菌 16S rRNA 系统发育树(NJ-k2 法, MEGA 6, bootstrap=1000)

Figure 3. 16S rRNA phylogenetic tree analysis of n-damo bacteria (NJ - k2 method, MEGA 6, the bootstrap=1000). The number in bracket represents the accession number, the cluster and sequence number in the parentheses followed the taxonomic subgroups represents the total cluster and sequence number, and the number 0.2 represents the mutation rate.

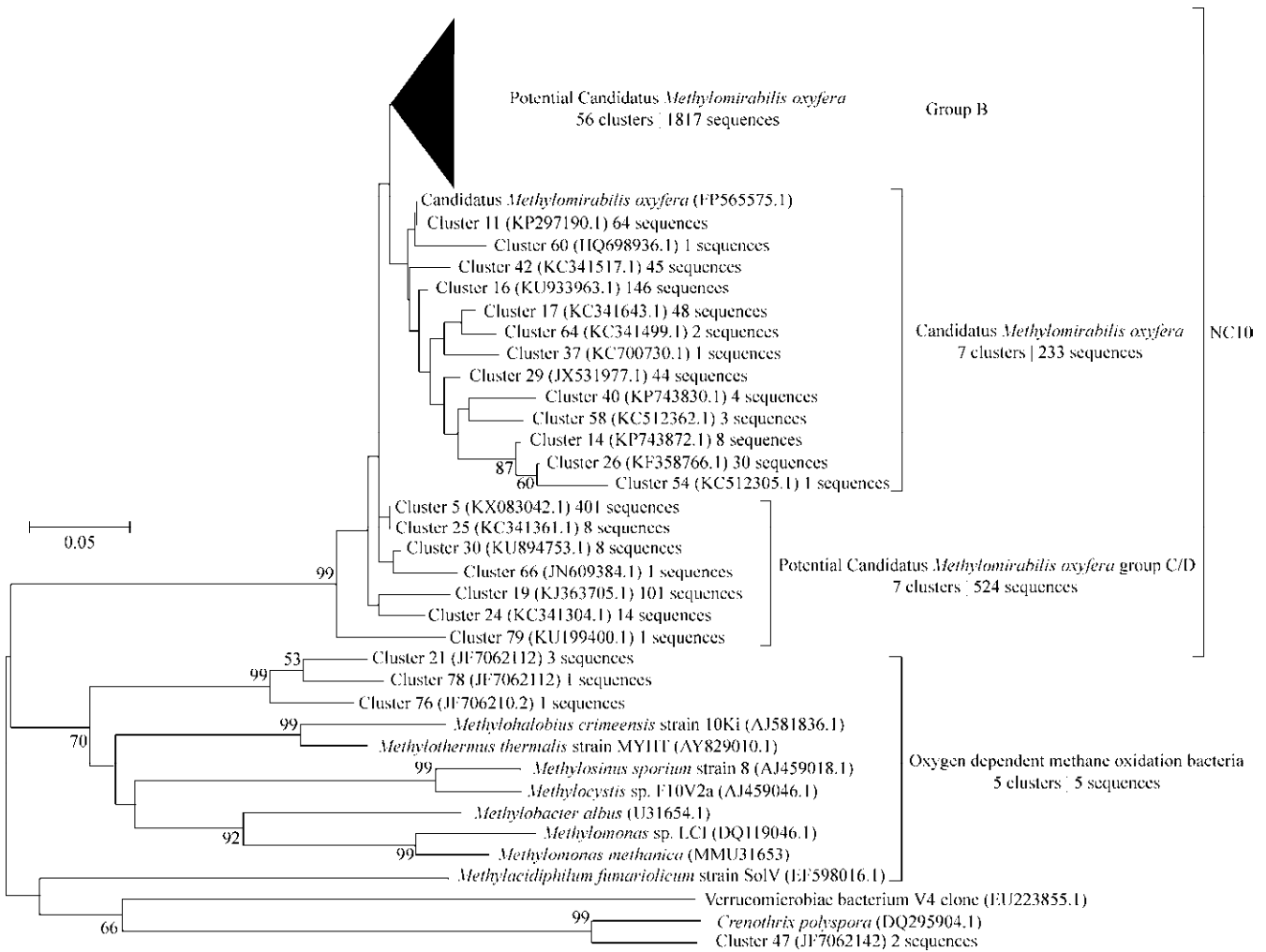


图 4. n-damo 细菌 *pmoA* 系统发育树(NJ-p distance 法, MEGA 6.0, bootstrap=1000)

Figure 4. *pmoA* phylogenetic tree analysis of n-damo bacteria (NJ-p distance method, MEGA 6, the bootstrap=1000). The number in bracket represents the accession number, the sequence number represent the total sequence number belonged to this cluster, the number on the branch represents the bootstrap credibility, and the number 0.05 represents the mutation rate.

2.3 二代测序中 n-damo 菌群的 OTU、多样性指数、系统发育分析及其同克隆文库对比分析

根据文献统计,二代测序来源的 n-damo 细菌一共有 4 组,其中 2 组用 16S rRNA(数据未在 SRA 数据库找到,本文只用文献报道的分析结果),另两组用 *pmoA* (表 1),具体数据如表 1 所示。克隆文库数据参考自 Shen 等综述论文^[14]。本研究中大九湖泥炭一共获得 8 个 OTU,香浓指数为 1.47,覆

盖度为 95.2%,占总的序列数目的 0.067% (表 1)。

进一步,在两组 454 *pmoA* 基因测序数据中与 Candidatus *M. oxyfera* 相似性大于 94% 的 OTU 代表性序列及其参考序列进行系统发育树构建,如图 5 所示。所有 OTU 都聚在 Candidatus *M. oxyfera* 这个类群,其中 group B 类群占比最大,group C/D 次之,此外,这些 n-damo 类群同依赖氧气型甲烷氧化菌类群明显分开。

表 1. **n-damo** 细菌已有二代测序数据结果统计表及其同克隆文库数据对比
 Table 1. Statistics of the second generation sequencing result for *n-damo* bacteria and its comparison with clone library data

Studying sites and environment	Sequencing platform/target gene	Total sequence number/ n-damosequence number	Total/n-damo coverage/%	n-damo relative abundance/%	Total OTU number/n-damo OUT number	Total/n-damo shannon index	Accession number	Reference
Zoige wetland	454/ <i>pmoA</i>	19048/3404	85/98.9	8.5	2900/39	7.87/1.66	SRX760439	Not available
Zoige wetland	454/ <i>pmoA</i>	19801/1693	85/91.4	17.8	2973/54	7.04/3.49	SRX760438	Not available
China Freshwater habitats	Illumina/16S rRNA	-/28-4811	-/92.9-99.8	0.4-2.5	11-97	1.81-3.09	-	Shen et al., (2016) ^[18]
Agriculture soils	Illumina/16S rRNA	-/-	-/-	0.1-4.5	26-71	2.18-3.19	-	Shen et al., (2016) ^[16]
Clone library dataset (referred to Shen et al., (2015) ^[14])	ABI3730/16S rRNA <i>pmoA</i>	Not available	Not available	-	3-30 1-16	-	-	Shen et al., (2015) ^[14]
Qinghai-Tibetan Plateau soil	454/16S rRNA	64381/70	90.0/95.7	0.109	3	7.03/0.29	SRP033622	Deng et al., (2014) ^[34]
southwestern Finland soil	454/16S rRNA	105393/209	96.8/96.2	0.198	8	4.82/1.34	ERS515436- ERS515450	Tsitko et al., 2014 ^[35]
Zoige peatland	Miseq/16S rRNA	286723/3219	99.6/99.7	1.122	10	5.81/1.35	PRJEB17863	Zhong et al., 2017 ^[36]
Dajiuhe Peatland	Illumina/16S rRNA	221480/148	98.5/94.6	0.067	8	6.69/1.47	/	This study

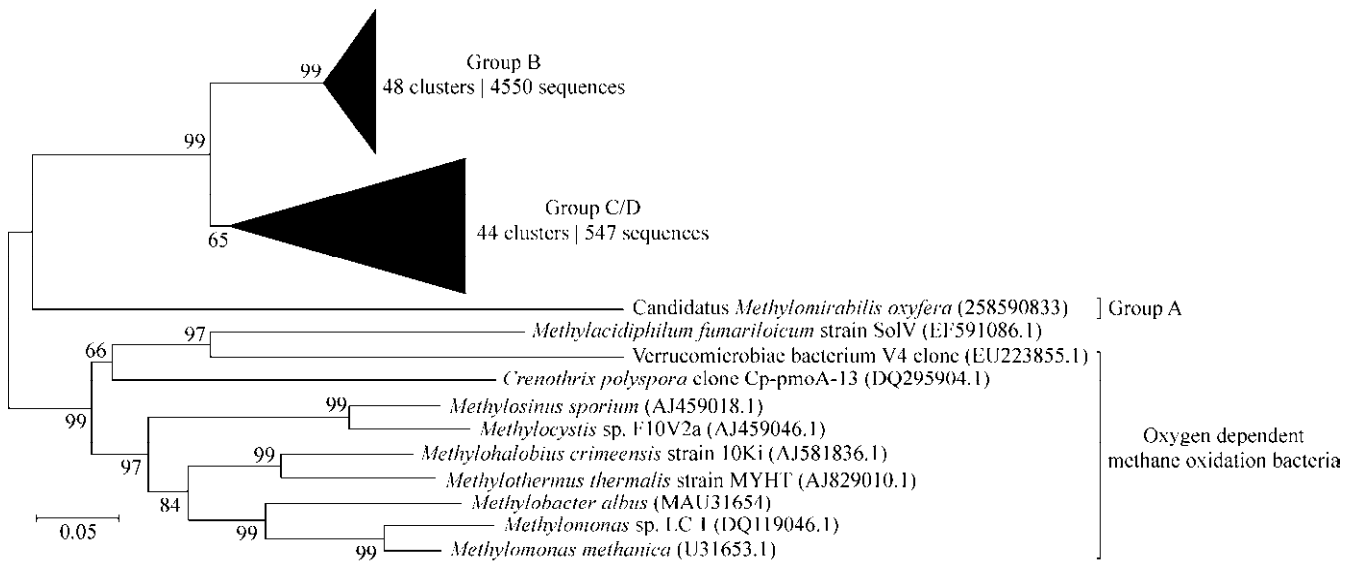


图 5. n-damo 细菌 *pmoA* 基于 454 平台测序数据代表性 OTU 的系统发育树(NJ-p distance 法, MEGA 6.0, bootstrap=1000)

Figure 5. representative OTUs' phylogenetic tree of n-damo bacteria based on *pmoA* from the 454 sequencing platform (NJ-p distance method, MEGA 6, the bootstrap=1000). The number in bracket represents the accession number, the cluster and sequence number followed the taxonomic subgroups represents the total cluster and sequence number, the number on the branch represents the bootstrap credibility, and the number 0.05 represents the mutation rate.

3 讨论

3.1 n-damo 细菌的分布

n-damo 群落主要分布在沉积物、湿地和水稻土等环境中,其独特的水文条件能够为 n-damo 的生存提供相对厌氧的环境,进而促进 n-damo 细菌群落的代谢^[29]。此外,沉积物与水稻土环境相对富含 $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$, 可以为 n-damo 的氮依赖型甲烷厌氧氧化提供充足的底物。同时,前人研究表明,沉积物与水稻土均为富含产甲烷菌的生态系统类型,其丰富的产甲烷菌群落为 n-damo 细菌提供甲烷源^[37]。因此,高含量的 NO_3^- 与 CH_4 浓度促使 n-damo 群落主要分布于沉积物与湿地环境。对比沉积物与湿地环境,泥炭中则具有较少的 n-damo 细菌(图 1)。虽然泥炭地也是重要的大气甲

烷源^[38], 并且具有相对厌氧环境,然而泥炭地氮含量相对较低,因而低浓度的 NO_3^- 无法支撑 n-damo 细菌的生长。此外,前人基于富集培养物的室内模拟实验发现温度也是可能影响 n-damo 类群的重要环境因子^[32]。因为无法统计分离位置的年平均温度或者原位温度等信息,因此无法展开温度与 n-damo 细菌的相关分析。

3.2 基于 16S rRNA 和 *pmoA* 基因检出率的差异

依据 16S rRNA 基因,同 Candidatus *M. oxyfera* 大于 94% 相似性的是具有氮依赖型甲烷厌氧氧化功能的类群 group A, 而相似性在 90%–93% 的归为 group B, 是潜在具有氮依赖型甲烷厌氧氧化功能的类群,其是否具有甲烷氧化功能还有待探明^[29]。而我们从数据库中获得的 Candidatus

M. oxyfera-like 的 16S rRNA 序列, 可能只有少量类群真正具有甲烷厌氧氧化功能(仅 5 条序列, 占整个检出 16S rRNA 序列约 0.2%, 图 3)。前人基于 Illumina 测序平台的 16S rRNA 二代测序数据发现, NC10 占整个数据量的 0.4%–2.5%^[18]和 0.8–4.5%, 平均检出率在 2% 左右^[16]。本次研究中, 大九湖泥炭表层中 NC10 序列只占到 0.067%, 比前人获得的丰度低 10 倍左右, 究其原因泥炭地氮含量相对较低, 因而低浓度的 NO_3^- 无法支撑 n-damo 进行氮依赖型甲烷厌氧氧化, 不利于 n-damo 的生存。前人研究发现, n-damo 的对甲烷通量的贡献只有 2%–6%^[4], 也暗示出其在环境中的丰度并不高。

从 *pmoA* 基因的系统发育树(图 4)可以看出, 真正具有 n-damo 功能的序列(属于 *Candidatus M. oxyfera*) 只占 10% 左右。而基于 454 平台的 n-damo 细菌 *pmoA* 基因显示, 真正属于 n-damo 细菌类群的只占总 *pmoA* 基因序列(见表 1)的 8.5% 和 17.8%。同时, 基于表 1 结果显示出 n-damo 细菌基于 *pmoA* 基因的平均检出率在 13% 左右。此外还可以看出, 相比较于 16S rRNA 基因, *pmoA* 基因更倾向于检出 *Candidatus M. oxyfera*, 平均检出率是 16S rRNA 基因的 7 倍左右。

前人通过二代测序结果也显示出, 属于 *Candidatus M. oxyfera* 这个类群的 16S rRNA 序列数目也仅为所有 16S rRNA 序列的 0.8%–4.5%^[16] 或 0.4%–2.5%^[18]。然而, 从对 Zoige (若尔盖) 泥炭地 *pmoA* 基因分析发现, 属于 *Candidatus M. oxyfera* 类群的序列数目为整个 *pmoA* 序列的 8.5% 和 17.8% (表 1)。因此, 可以看出二代测序检测 n-damo 细菌中, 用 *pmoA* 基因检出率是 16S rRNA 检出率的 3.4–44.5 倍。

针对 n-damo 类群, 无论是克隆文库还是二代测序, 无论是 16S rRNA 还是 *pmoA* 基因, 依据表 1 可以看出, OTU 数目都在 1–2 个数量级, 香浓-维纳多样性在 1.4–3.4 之间, 显示出 n-damo 细菌这个类群种群数目比较稳定, 也进一步暗示该类群微生物行使的生态功能比较专一。

3.3 具有氮依赖型甲烷厌氧氧化功能的亚类群相对稀少

图 3、图 4 和图 5 系统发育分析可以看出, 属于 group A (*Candidatus M. oxyfera*) 的 OTU 和序列数目, 无论是用克隆文库还是二代测序, 均属于稀有类群, 而其他类群(Group B、C 和 D) 含量相对较高。

这同前人基于 16S rRNA 的二代数据系统发育分析相符合, 属于 group A 的只包含 1–7 号 OTU, 属于 Group B、C 和 D 分别包含 8–81 号 OTU、82–96 号和 97–115 号 OTU, 其中 Group B 的含量占整个类群的 80% 以上^[16]。同样, 基于 16S rRNA 二代测序的另一个研究的系统发育树分析也显示出, Group A 只占 10% 不到, 而 Group B 占 70% 以上^[18]。而本次基于前人数据 n-damo 细菌的二代测序(*pmoA* 基因)进行系统发育分析中, 属于 Group A 的未检出, 主要是 Group B 和 C/D 类群。这说明, 无论是 *pmoA* 基因还是 16S rRNA 基因, 真正具有氮依赖型甲烷厌氧氧化的类群(Group A) 只占很少的一部分。暗示我们在评估 n-damo 细菌的真正生态功能效果时需要谨慎, 最好借助 N 同位素标记的方法来进行准确评估。

4 结论

为了更好地研究 n-damo 类群的生活环境、评

估其基于 16S rRNA 和 *pmoA* 基因分子标记的检出率、不同 n-damo 类群的相对丰度和厌氧氧化甲烷的生态潜能,基于整合分析的思想,本文从 NCBI 核酸数据库中(数据搜集到 2016 年 11 月)将所有同 n-damo 细菌相关的序列(16S rRNA 和 *pmoA* 的克隆文库和二代测序数据)进行提取,通过 RDP pipeline 和 linux 系统简单命令操作再综合系统发育树分析,同时,对大九湖泥炭地表层泥炭进行 16S rRNA 二代测序分析特征提取 NC10 序列并进行深入分析,最终得出如下结论:一、n-damo 细菌主要分布于沉积物中,其次为湿地与水稻田土,暗示水文条件引起的微厌氧环境有利于该类群的生存代谢,贫氮的泥炭地中 NC10 含量很少,只占到 0.067%;二、16S rRNA 划分 OTU 的阈值 0.03 对应 *pmoA* 基因划分 OTU 的阈值 0.05,符合前人划分功能基因 OTU 采用的经典阈值。三、基于 *pmoA* 基因的 n-damo 细菌的检出率(8.5%–17.8%)是 16S rRNA 基因的检出率(0.2%–4.5%)的 3.4–44.5 倍,但是 OTU 数目(处于 1–2 个数量级)和香浓-维纳指数(1.6–3.4)保持相对稳定,同时,n-damo 细菌的数量分别占有 16S rRNA 和 *pmoA* 基因的 2%和 13%左右,暗示该类种群相对稳定,其行使的生态功能相对单一;四、具有真正氮依赖型甲烷厌氧氧化功能群的 Group A 可能只占很少的一部分(小于 20%),而其他类群丰度占到 70%以上,进一步暗示该类群真正的生态潜能可能与之前报道的占甲烷消耗通量的 2%–6%相符合。本次整合分析为更好地了解 n-damo 细菌群落的生态分布、不同分子标记物基因用于研究该类群的检出率、生活环境、不同亚类群比如 Group A 和 Group B 等的丰度和其可能的潜在生态功能提供参考。

本文对 n-damo 的整合分析主要聚焦陆地环境,而对海洋环境的分析较少,前人已经发现 Group C/D 存在于海洋环境中,富集培养实验对于探究 Group C/D 在海洋中的生态功能具有重要意义。同时,陆地环境中出现的高丰度类群 Group B,对于其是否具有真正生态潜能还有很多工作需要开展,通过富集培养、转录组分析必将有助于揭示这个类群的生态功能。

致谢

本研究感谢国家海洋局第三海洋研究所环境微生物课题组黄兆斌等在数据分析上的帮助。

参考文献

- [1] Core Writing Team, Pachauri RK, Reisinger A. Climate change 2007: synthesis report/Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva, Switzerland: IPCC, 2007.
- [2] Knittel K, Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 311–334.
- [3] Bodelier PL. Interactions between nitrogenous fertilizers and methane cycling in wetland and upland soils. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2011, 3(5): 379–388.
- [4] Hu BL, Shen LD, Lian X, Zhu Q, Liu S, Huang Q, He ZF, Geng S, Cheng DQ, Lou LP, Xu XY, Zheng P, He YF. Evidence for nitrite-dependent anaerobic methane oxidation as a previously overlooked microbial methane sink in wetlands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(12): 4495–4500.
- [5] Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MMM, Schreiber F, Dutilh BE, Zedelius J, de Beer D, Gloerich J, Wessels HJCT, van Alen T, Luesken F, Wu ML, van de Pas-Schoonen KT, Op den Camp HJ, Janssen-Megens EM, Francoijs KJ, Stunnenberg H, Weissenbach J, Jetten MS, Strous M. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 2010, 464(7288): 543–548.

- [6] Kampman C, Hendrickx TLG, Luesken FA, van Alen TA, Op den Camp HJ, Jetten MSM, Zeeman G, Buisman CJN, Temmink H. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria for application after direct low-temperature anaerobic sewage treatment. *Journal of hazardous materials*, 2012, 227: 164–171.
- [7] Kampman C, Hendrickx TLG, Luesken FA, van Alen TA, den Camp HJMO, Jetten MSM, Zeeman G, Buisman CJN, Temmink H. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria for application after direct low-temperature anaerobic sewage treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 227-228: 164–171.
- [8] Zhu BL, van Dijk G, Fritz C, Smolders AJP, Pol A, Jetten MSM, Ettwig KF. Anaerobic oxidization of methane in a minerotrophic peatland: enrichment of nitrite-dependent methane-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(24): 8657–8665.
- [9] He ZF, Cai C, Shen LD, Lou LP, Zheng P, Xu XH, Hu BL. Effect of inoculum sources on the enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(2): 939–946.
- [10] Kojima H, Tsutsumi M, Ishikawa K, Iwata T, Mussmann M, Fukui M. Distribution of putative denitrifying methane oxidizing bacteria in sediment of a freshwater lake, Lake Biwa. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 35(4): 233–238.
- [11] Shen LD, Zhu Q, Liu S, Du P, Zeng JN, Cheng DQ, Xu XY, Zheng P, Hu BL. Molecular evidence for nitrite-dependent anaerobic methane-oxidising bacteria in the Jiaojiang Estuary of the East Sea (China). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(11): 5029–5038.
- [12] Shen LD, Liu S, Zhu Q, Li XY, Cai C, Cheng DQ, Lou LP, Xu XY, Zheng P, Hu BL. Distribution and diversity of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidising bacteria in the sediments of the Qiantang River. *Microbial Ecology*, 2014, 67(2): 341–349.
- [13] Kojima H, Tokizawa R, Kogure K, Kobayashi Y, Itoh M, Shiah FK, Okuda N, Fukui M. Community structure of planktonic methane-oxidizing bacteria in a subtropical reservoir characterized by dominance of phylotype closely related to nitrite reducer. *Scientific Reports*, 2014, 4: 5728.
- [14] Shen LD, Wu HS, Gao ZQ. Distribution and environmental significance of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidising bacteria in natural ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(1): 133–142.
- [15] Zhu GB, Zhou LL, Wang Y, Wang SY, Guo JH, Long XE, Sun XB, Jiang B, Hou QY, Jetten MSM, Yin CQ. Biogeographical distribution of denitrifying anaerobic methane oxidizing bacteria in Chinese wetland ecosystems. *Environmental Microbiology Reports*, 2015, 7(1): 128–138.
- [16] Shen LD, Wu HS, Gao ZQ, Li J, Liu X. Presence of diverse *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*-like bacteria of NC10 phylum in agricultural soils. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 120(6): 1552–1560.
- [17] Wang Y, Huang P, Ye F, Jiang Y, Song LY, Op Den Camp HJM, Zhu GB, Wu SJ. Nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria along the water level fluctuation zone of the Three Gorges Reservoir. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(4): 1977–1986.
- [18] Shen LD, Wu HS, Gao ZQ, Liu X, Li J. Comparison of community structures of *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*-like bacteria of NC10 phylum in different freshwater habitats. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25647.
- [19] Yan PZ, Li MC, Wei GS, Li H, Gao Z. Molecular fingerprint and dominant environmental factors of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria in sediments from the Yellow River Estuary, China. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137996.
- [20] Bhattacharjee AS, Motlagh AM, Jetten MSM, Goel R. Methane dependent denitrification- from ecosystem to laboratory-scale enrichment for engineering applications. *Water Research*, 2016, 99: 244–252.
- [21] Kool DM, Zhu B, Rijpstra WIC, Jetten MSM, Ettwig KF, Sinninghe Damsté JS. Rare Branched Fatty Acids Characterize the Lipid Composition of the Intra-Aerobic Methane Oxidizer “*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*”. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(24): 8650–8656.
- [22] Ettwig KF, Shima S, de Pas Schoonen V, Katinka T, Kahnt J, Medema MH, Op den Camp HJ, Jetten MS, Strous M. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of *Archaea*. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3164–3173.
- [23] Shen LD, Liu S, Huang Q, Lian X, He ZF, Geng S, Jin RC, He YF, Lou LP, Xu XY, Zheng P, Hu BL. Evidence for the

- cooccurrence of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane oxidation processes in a flooded paddy field. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(24): 7611–7619.
- [24] Deutzmann JS, Stief P, Brandes J, Schink B. Anaerobic methane oxidation coupled to denitrification is the dominant methane sink in a deep lake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(51): 18273–18278.
- [25] Zhu Q, Shen LD, Hu BL, Lou LP, Cheng DQ. Molecular detection of denitrifying anaerobic methane oxidizing bacteria in the sediment of West Lake, Hangzhou. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(5): 1321–1325. (in Chinese)
朱群, 沈李东, 胡宝兰, 楼莉萍, 程东庆. 西湖底泥中的反硝化型甲烷厌氧氧化菌的分子生物学检测. *环境科学学报*, 2013, 33(5): 1321–1325.
- [26] Shen LD, Hu BL, Zheng P. Progress in study on microorganisms responsible for anaerobic oxidation of methane. *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(3): 619–628. (in Chinese)
沈李东, 胡宝兰, 郑平. 甲烷厌氧氧化微生物的研究进展. *土壤学报*, 2011, 48(3): 619–628.
- [27] Zhang MZ, Li L, Liu JX. The parth way and methanotroph of anaerobic methane oxidation driven by nitrate or sulfate. *Microbiology China*, 2012, 39(5): 702–710. (in Chinese)
张梦竹, 李琳, 刘俊新. 硝酸盐和硫酸盐厌氧氧化甲烷途径及氧化菌群. *微生物学通报*, 2012, 39(5): 702–710.
- [28] Zhu JP, Sun L. Research progress of anaerobic oxidation of methane. *China Biogas*, 2010, 28(2): 30–33, 37. (in Chinese)
朱静平, 孙丽. 甲烷厌氧氧化技术研究进展. *中国沼气*, 2010, 28(2): 30–33, 37.
- [29] Shen LD. A review of study on microbial ecology of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation. *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52(4): 713–722. (in Chinese)
沈李东. 亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化微生物生态学研究进展. *土壤学报*, 2015, 52(4): 713–722.
- [30] Luesken FA, Van Alen TA, van der Biezen E, Frijters C, Toonen G, Kampman C, Hendrickx TLG, Zeeman G, Temmink H, Strous M, Op den Camp HJM, Jetten MSM. Diversity and enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria from wastewater sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(4): 845–854.
- [31] Zhou JY, Liu DX, He CQ, Liu XY, Shen YF, Long XE, Chen XP. Molecular detection of diversity of anaerobic methanotroph in soil. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(11): 3491–3503. (in Chinese)
周京勇, 刘冬秀, 何池全, 刘晓艳, 沈燕芬, 龙锡恩, 陈学萍. 土壤中甲烷厌氧氧化菌多样性的分子检测. *生态学报*, 2015, 35(11): 3491–3503.
- [32] Ettwig KF, Van Alen T, van de Pas-Schoonen KT, Jetten MS, Strous M. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3656–3662.
- [33] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- [34] Deng YC, Cui XY, Hernández M, Dumont MG. Microbial diversity in hummock and hollow soils of three wetlands on the Qinghai-Tibetan Plateau revealed by 16S rRNA pyrosequencing. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103115.
- [35] Tsitko I, Lusa M, Lehto J, Parviainen L, Ikonen AT, Lahdenperä A, Bomberg M. The variation of microbial communities in a depth profile of an acidic, nutrient-poor boreal bog in southwestern Finland. *Open Journal of Ecology*, 2014, 4(13): 50840.
- [36] Zhong QP, Chen H, Liu LF, He YX, Zhu D, Jiang L, Zhan W, Hu J. Water table drawdown shapes the depth-dependent variations in prokaryotic diversity and structure in Zoige peatlands. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93(6), doi: 10.1093/femsec/fix049.
- [37] Bridgham SD, Cadillo-Quiroz H, Keller JK, Zhuang QL. Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. *Global Change Biology*, 2013, 19(5): 1325–1346.
- [38] Xu H, Lan JH, Sheng EG, Liu Y, Liu B, Yu KK, Ye YD, Cheng P, Qiang XK, Lu FY, Wang XL. Tropical/Subtropical peatland development and global CH₄ during the Last Glaciation. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30431.

Integrated analysis of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria

Lizhen Jiang^{1#}, Jiang Liu^{2#}, Xing Xiang³, Renju Liu², Ruicheng Wang³, Linfeng Gong^{1*}

¹ Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, Fujian Province, China

² School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang Province, China

³ State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan 430074, Hubei Province, China

Abstract: Over the past 10 years, study on nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria (n-damo bacteria) is a hot topic in the field of microbial ecology. However, the integrated analysis of these groups based on available database has not been reported. **[Objective]** In order to give a full overview including ecological distribution, community structure and phylogenetic diversity. **[Methods]** All n-damo bacteria related sequences from NCBI databases (data collected until November 2016) and together with our experimental data from Dajiuhu surface peat samples through 16S rRNA illumina sequencing were set to do the bioinformatics analysis. **[Results]** n-damo bacteria were mainly detected in the sediment, wetlands and paddy soil. The average detection rate of n-damo bacteria based on *pmoA* gene was 7 times more than that based on 16S rRNA gene, whereas Shannon-Wiener index (1.4–3.4) remained relatively stable. The abundance of NC10 was only 0.067% from Dajiuhu peatland, which was the lowest abundance in all published data, indicating nitrogen was a limiting factor for NC10. Group A including *Methyloirabilis oxyfera* which had been test to have the anaerobic methane oxidation accounts for only a little bit (less than 20%), suggesting that the real ecological potential of methane consumption by n-damo bacteria need more deep study. **[Conclusion]** The integrated analysis on n-damo bacteria deepen our knowledge of this functional group and may give some guideline for further study.

Keywords: nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria (n-damo bacteria), integrated analysis, community structure, phylogenetic analysis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the the Scientific Research Foundation of Third Institute of Oceanography, SOA (2015018)

*Corresponding author. Tel: +86-592-2195291; E-mail: gonglinfeng@tio.org.cn

#Those authors contributed equally to this work.

Received: 15 September 2017; Revised: 3 January 2018; Published online: 16 January 2018