

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(9):1090-1096; 4 September 2014
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.09.014

若尔盖高原湿地土壤氨氧化古菌的多样性

郑有坤^{1,2}, 王宪斌¹, 辜运富^{1*}, 张小平¹

¹四川农业大学资源环境学院, 四川 成都 611130

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

摘要:【目的】研究自然界中氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)对于理解全球氮循环起着至关重要的作用,但人们对高原湿地 AOA 种群生态还知之甚少。本研究旨在了解若尔盖高原湿地土壤 AOA 群落组成及多样性。【方法】从若尔盖高原阿西(A'xi)、麦西(Maixi)和分区(Fenqu) 3 个典型牧区采集土壤样品,提取土壤总 DNA,利用 AOA 氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, *amoA*)基因通用引物扩增 *amoA* 基因,构建 *amoA* 基因克隆文库。从每个克隆文库中随机挑选 80 个阳性克隆子用于后续限制性酶切片长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析,挑选不同酶切类型的克隆子进行测序、比对,利用 MEGA 5.0 软件构建 *amoA* 基因系统发育树。【结果】从 3 个克隆文库共 240 个 AOA *amoA* 基因阳性克隆中得到 15 条代表序列,通过 Mothur 软件进行 OTUs (operational taxonomic units) 分类得到 7 个不同的分类单元。其中 OTU 6 为优势类群,在 3 个克隆文库均有发现,约占所有特异性克隆子的 27%。15 条 *amoA* 基因序列分属于 Zoige Wetland Clade 1 (4 OTUs)、Zoige Wetland Clade 2 (2 OTUs) 和 Zoige Wetland Clade 3 (1 OTU) 3 个系统发育分支。BLAST 分析显示所有 OTUs 均归于泉古菌门(Crenarchaeota)。相关性分析表明,若尔盖高原湿地 AOA 多样性指数与土壤铵态氮和硝态氮含量存在显著的相关性($P < 0.05$)。【结论】若尔盖高原湿地中 AOA 多样性较低,均属于泉古菌,且与土壤中氨态氮和硝态氮密切相关。

关键词:若尔盖湿地, 氨氧化古菌, *amoA* 基因, 多样性

中图分类号:Q939 **文章编号:**0001-6209(2014)09-1090-07

微生物介导的氮素循环是生物地球化学循环最基础和最重要的过程。自然界中氮循环主要包括固氮作用、硝化作用、反硝化作用和氨化作用 4 个过程,每个过程均由微生物所驱动^[1]。其中氨氧化($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$)是硝化作用过程中的第一步和关键限制反应,是整个氮循环中最关键生物学过程^[2]。多年来,这一过程被认为是主要由一小部分属于 β -

proteobacteria 和 γ -*proteobacteria* 的氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)所执行的专性好氧化能自养过程^[3],*amoA* 基因编码催化这一生化反应的关键酶氨单加氧酶(ammonia monooxygenase)。但随着 *amoA* 基因在泉古菌中被发现,以及泉古菌 *Nitrosopumilus maritimus* 获得纯培养^[4],表明泉古菌在氨氧化过程中发挥重要作用,

基金项目:国家自然科学基金(D010504);四川省自然科学基金(SC200902158);四川农业大学“双支计划”(01470702)

* 通信作者。Tel: +86-28-86290982; E-mail: gungyf@163.com

作者简介:郑有坤(1990-),男,四川乐山人,硕士研究生,主要从事微生物多样性研究。E-mail: zyktmx@163.com

收稿日期:2013-12-10; **修回日期:**2014-01-23

AOA 随即成为全球氮循环微生物机理研究的前沿内容之一^[5]。

湿地是介于陆生和水生生态系统间的过渡性生态系统,具有维系地表生物多样性和生态平衡的重要功能^[6]。若尔盖高原沼泽湿地位于青藏高原东北隅,是世界上为数不多的低纬度永久冻土湿地,具有高海拔、高紫外辐射、高有机质含量等特点^[7]。同时,若尔盖湿地也是我国面积最大的高原沼泽湿地分布区,是中国生物多样性关键地区之一,在调节水资源平衡、稳定流域生态平衡等方面具有不可替代的地位^[8-10]。目前,我国学者已较系统研究了若尔盖高原湿地土壤产甲烷古菌和细菌的多样性^[7-8, 11-12],而对反映氮循环的氨氧化微生物却未见任何相关报道。因此,研究该环境中氨氧化微生物的多样性,无论对湿地生物多样性保护还是对其中氨氧化过程机制的研究都具有积极的意义。

amoA 基因因其高度保守性,已被广泛应用于各种生态系统中 AOA 群落结构和种群多样性的研究,如海洋^[13]、河口沉积物^[14]、土壤^[15]、废水生物反应器^[16]、陆地温泉^[17]、干涸湖泊^[18]、高原冷泉^[19]等。本文以若尔盖高原湿地沼泽土为供试材料,构建 *amoA* 基因克隆文库。通过研究 AOA 的系统发育多样性,为深入研究高原湿地生态系统的氨氧化发生机制及氮素循环特征、开发利用功能微生物奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样点介绍和样品采集:若尔盖高原湿地地处青藏高原东北部,主体位于四川省红原县和若尔盖县(32°20' - 34°00' N, 101°30' - 103°30' E),平均海拔 3400 - 3600 m,总面积 19600 km²,是青藏高原构造隆起而形成的一个典型低纬度高原湿地。气候属于青藏高原影响下的大陆性高原气候,没有明显的四季之分,长冬无夏。年平均降水量为 650 - 750 mm,年平均气温为 0.6 - 1.2 °C,冷湿的气候为沼泽土发育提供水热条件,使得本区成为我国重要的高原泥炭沼泽土分布区。区内植被以沼泽植被和草甸植被为主,主要类型有藏蒿草(*Kobresia tibetica*)、四川蒿草(*Kobresia setchuanensis*)、羊茅(*Festuca nivina*)、木里薹草(*Carex muliensis*)、披碱草(*Elymus*

valleculosa)、苔藓(*Leptodictyum riparium*)等。

于 2008 年 10 月在查阅有关资料的基础上,选取若尔盖县阿西(A'xi)、麦溪(Maixi)和分区(Fenqu)3个典型牧区湿地 *E. valleculosa* 覆盖下的沼泽土为研究样品,每个牧区按照“梅花型”原则进行采样,样地面积约 0.15 hm²,布设 9 个采样点,用土钻取 10 - 20 cm 的土样,按四分法进行混匀,取 1 kg 混后土样,用无菌 PE 袋封装,放于冰盒中带回实验室, - 20 °C 保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器:PCR 仪(BIO-RAD)、凝胶成像仪(BIO-RAD)、电泳仪(BIO-RAD)、离心机(Eppendorf,德国)、Fast DNA Spin Kit for Soil 试剂盒(MP BIO, USA)、PCR 引物(生工,上海)、内切酶 *Hae* III、*Rsa* I (Fermentas)、pMD-19T Vector (TaKaRa,大连)

1.2 土壤理化性质测定

土壤铵态氮和硝态氮采用 2 mol/L KCl 浸提,SKALAR SAN++ 连续流动分析仪测定,其余理化性质的测定参照鲁如坤^[20]的方法进行。

1.3 土壤总 DNA 的提取及 *amoA* 基因的扩增

1.3.1 土壤总 DNA 的提取:称取 0.5 g 风干土样,利用 Fast DNA Spin Kit for Soil 提取试剂盒提取样品中的总 DNA。

1.3.2 *amoA* 基因的扩增:采用 AOA *amoA* 基因通用引物 *amoAF/amoAR*^[19] 进行扩增。反应体系(50 μL): 10 × Buffer 4 μL, MgCl₂ (2.5 mmol/L) 4 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL, BSA (2.5 mg/mL) 1 μL, *Taq* DNA Polymerase (2.5 U/μL) 1 μL, 正反向引物(10 mmol/L) 各 1 μL, 10 倍稀释 DNA 模板 1 μL, 加 ddH₂O 至终体积 50 μL。反应在 S1000™ Thermal Cycler PCR 仪(BIO-RAD)上进行。PCR 扩增程序参照文献[17]。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后用 Clean-Up™ 试剂盒(MO BIO Labs, Solana Beach, CA, USA)纯化。

1.4 *amoA* 基因克隆文库的构建和 RFLP 分析

PCR 产物纯化后与 pMD-19T Vector 进行连接,利用 *E. coli* DH5α 感受态细胞进行转化,以氨苄青霉素(100 mg/L)抗性和 PCR 检测。用 T 载体通用引物 M13-47 和 M13-48 对阳性克隆插入片段进行 PCR 扩增,取 5 μL PCR 产物分别用 5 U *Hae* III 和 *Rsa* I 酶切。酶切产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,分型。根据酶切谱型挑选代表性克隆送上海生

工测序。

1.5 系统发育分析

将所得序列去载体后在 GenBank 中进行 BLAST 同源性检索 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), 利用 Mothur 软件在 98% 的相似性水平上进行可操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs) 分析^[17-19]。将获得的同源序列和测定序列用 Clustal X 进行分析, 采用 MEGA 5.0 软件包中的 Kimura2-Parameter Distance 模型进行多序列匹配, 用邻接法 (Neighbor-joining) 构建系统发育树, Bootstrap 1000 次检测各分支的置信值。共获得 15 条有效 AOA *amoA* 基因序列, 在 NCBI 数据库中的序列登录号: JQ941726-JQ941740。

1.6 数据分析

运用公式 $C = 1 - \frac{n}{N}$ 计算文库覆盖度 C , n 代表

在克隆文库中仅出现一次的 OTUs 的数量, N 代表克隆文库库容。根据 Shannon-Wiener 指数, 均匀度指数和丰富度指数评估 AOA *amoA* 基因文库多样性, 计算方法参照文献^[18]。数据间的显著性分析采用 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago) 软件进行。

2 结果和分析

2.1 若尔盖高原湿地土壤理化性质分析

若尔盖高原湿地土壤的物理化学指标测定结果表明, 3 个样点土壤均为中性或弱碱性土壤, 有机质含量高, 铵态氮含量较低, 分区样点土壤铵态氮含量仅为 0.017 mg/kg。A'xi、Maixi、Fenqu 3 个样点沼泽土土壤理化性质各不相同, 呈降低趋势 (表 1)。

表 1. 若尔盖高原湿地土壤理化性质

Table 1. Physicochemical properties of the soil from Zoige plateau wetland

sampling site	OM/ (g/kg)	TN/ (g/kg)	ammonia/ (mg/kg)	(nitrite/nitrate)/ (mg/kg)	pH	air-dry soil moisture /%	sampling temperature /℃
A'xi (阿西)	49.67	1.515	1.172	5.362	7.61	6.28	-6
Maixi (麦溪)	49.40	1.199	0.572	3.166	7.86	5.13	-5
Fenqu (分区)	26.68	0.902	0.017	0.579	6.85	4.88	-5

OM: Organic matter, TN: Total nitrogen. Soil pH was determined with a compound electrode (E-201-C, Shanghai Shengguang Instrument. Co. Ltd. Shanghai, China) using a soil-to-water ratio of 1:1.

2.2 若尔盖高原湿地 AOA *amoA* 基因克隆文库多样性分析

从 3 个克隆文库中共挑选到 240 个阳性克隆, 通过 *Hae* III 和 *Rsa* I 两种限制性内切酶进行酶切, 初步分型, 根据初步酶切分型结果, 共选择 15 个代表克隆测序, 按序列相似性大于 98% 归为一个 OTUs, 15 个序列共分为 7 个 OTUs, A'xi、Maixi、

Fenqu 3 个样品的 AOA *amoA* 基因的 OTUs 数分别为 6 个、3 个、3 个。3 个样点土壤 AOA *amoA* 基因克隆文库覆盖度分别为 0.91, 0.94, 0.95 (表 2)。A'xi、Maixi、Fenqu 3 个土样的 AOA *amoA* 基因多样性指数存在较大差异, 阿西样点的 Shannon-Wiener 指数、丰富度指数均高于其他 2 个样点, 均匀度指数相差不大 (表 2)。

表 2. 若尔盖高原湿地土壤 AOA *amoA* 基因克隆文库多样性

Table 2. AOA diversity index in *amoA* gene clone library of Zoige plateau wetland

sampling site	OTU numbers	coverage(C)	Shannon's diversity index (H')	richness(S)	evenness(Eh)
A'xi (阿西)	6	0.91	2.14	2.97	0.96
Maixi (麦溪)	3	0.94	1.43	2.33	0.97
Fenqu (分区)	3	0.95	1.25	2.05	0.93

2.3 若尔盖高原湿地 AOA *amoA* 基因系统发育分析

基于 2% 的序列差异, 15 个 AOA *amoA* 基因克隆序列被划归为 7 个 OTUs, 分别是 OTU1 (JQ941726, JQ941740)、OTU2 (JQ941727)、OTU3 (JQ941728, JQ941731)、OTU4 (JQ941729,

JQ941730)、OTU5 (JQ941732)、OTU6 (JQ941733, JQ941734, JQ941735, JQ941736) 和 OTU7 (JQ941737, JQ941738, JQ941739), 均属于泉古菌门 (Crenarchaeota)。系统发育分析将这些 OTUs 分成 3 个组群: Zoige Wetland Clade 1, 包含 4 个 OTUs;

Zoige Wetland Clade 2, 包含 2 个 OTUs; Zoige Wetland Clade 3, 包含 1 个 OTU。在 7 个 OTUs 中, 仅有 OTU6 在 3 个样点均检测到, 占 15 个特异性克

隆子的 27%, 其 *amoA* 基因与在青藏高原湖泊沉积物和长期施用氮肥的冰岛草原土壤检测到的 *amoA* 基因亲缘关系密切, 聚为一支 (图 1)。

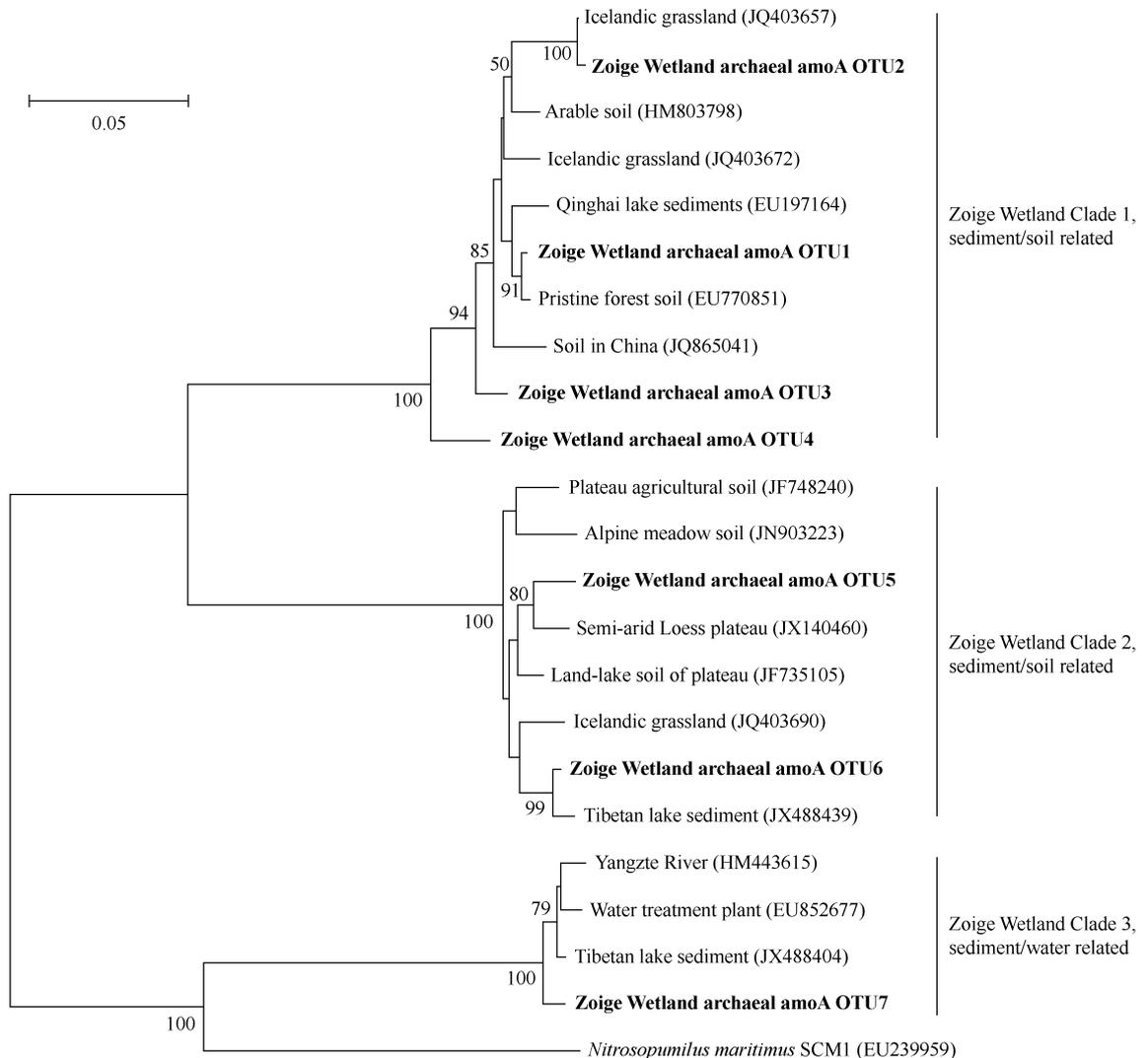


图 1. 基于 *amoA* 基因构建的若尔盖高原湿地土壤氨氧化古菌系统发育树

Figure 1. Phylogenetic analysis of archaeal *amoA* gene sequences retrieved from the Zoige plateau wetland in China. Bootstrap values were calculated from 1000 replications of Kimura 2-parameter, and bootstrap values higher than 50% are shown. The scale bar represents 0.05 changes per sequence position.

在 7 个 OTUs 中, OTU7 与来自水环境的 *amoA* 基因高度相似, 其余 6 个 OTUs 的序列与在湖泊沉积物和土壤环境检测到的序列高度相似。OTU1 以 99.5% 的序列相似性与奥地利原始森林土壤 *amoA* 基因序列 (EU770851) 聚在一起; OTU2 与长期施用氮肥的冰岛草原土壤 *amoA* 基因序列 (JQ403657) 相似性为 99.7%; OTU3 和 OTU4 分别仅以 95.6% 和 93.4% 的序列相似性与冰岛草原土壤 *amoA* 基因序

列 (JQ403657) 聚在一起; OTU5 与来自黄土高原半干旱土壤 *amoA* 基因 (JX140460) 相似性最高, 为 97.6%; OTU6 与青藏高原湖泊沉积物的 *amoA* 基因 (JX488439) 序列相似性为 99%; OTU7 大多与来自淡水环境的 *amoA* 基因 (如 HM443615 和 EU852677) 聚在一起, 而与目前为止唯一的可培养 AOA 菌株 *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 (EU239959) 的序列相似性仅为 80.2% [4]。

2.4 若尔盖高原湿地土壤理化性质与 AOA 多样性的相关分析

以 AOA *amoA* 基因多样性指数 (H') 为参数, 通过 SPSS 软件计算 Pearson 相关系数, 评价了若尔盖

高原湿地土壤理化性质对 AOA 多样性的影响。结果表明, AOA *amoA* 基因多样性指数 (H') 与铵态氮和硝态氮之间存在显著的相关性 ($P < 0.05$), 与其他土壤理化性质的相关性不显著 (表 3)。

表 3. 若尔盖高原湿地土壤理化性质与 AOA 多样性指数间的相关性

Table 3. Correlation coefficient between soil physico-chemical characteristics and

Shannon diversity index (H') in Zoige plateau wetland

sampling site	OM	TN	ammonia	nitrite/nitrate	pH	air-dry soil moisture
A'xi (阿西)	0.976	0.435	-0.999**	0.999*	0.794	0.607
Maixi (麦溪)	-0.638	0.679	0.998*	0.999*	-0.444	0.999*
Fenqu (分区)	-0.702	0.511	-0.999*	-0.999*	-0.376	-0.161

OM: organic matter, TN: total nitrogen, * and ** mean significantly different at 0.05 and 0.01 level, respectively (2-tailed).

3 讨论

若尔盖高原湿地是典型的低纬度低温湿地系统, 土壤类型以富含有机质的沼泽土为主。土壤微生物是土壤质量最灵敏的指标之一, 研究该类环境中 AOA 对于认识 AOA 的生态分布以及该环境氮循环机制都具有重要意义。本文对若尔盖高原湿地 AOA 的多样性和系统发育地位研究表明, 若尔盖高原湿地大多数 *amoA* 序列与来自土壤和沉积物的序列相似性较高, 均属于泉古菌, 推测这可能是长期的低温导致该环境中 AOA 种群的种群相对单一, 且这些 AOA 类群生态位分布相对较窄。

已有的研究表明, AOA 广泛分布于各种生态系统中, 对生态系统氨氧化过程中起着重要作用。本研究发现 AOA 也广泛存在于高寒湿地系统中, 这可能与 AOA 多样的营养类型有关^[21]。同时, 本研究采用 AOB *amoA* 基因通用引物^[19]进行扩增, 但未检测到 AOB *amoA* 基因, 推测可能是若尔盖高原湿地中 AOB 丰度远远低于 AOA。若尔盖高原湿地的氨氧化微生物优势种群为 AOA, 这与 Leininger^[15]、黄柳琴等^[22]的研究结果相似。这一结果也可以从若尔盖土壤铵态氮含量较低得到佐证, 因为 AOB 是严格的化能自养微生物, 仅能利用氨氮作为其唯一能量来源^[23]。

环境因子如土壤含水量、pH 和营养成分是决定 AOA 种群组成和多样性的重要因素^[24]。在本研究中, AOA 多样性指数 (H') 与铵态氮和硝态氮之间存在显著的相关性 ($P < 0.05$), 这与之前的研究结果相似^[18]。这也说明 AOA 在若尔盖高原湿地氨氧化

过程中起到关键作用。

本文首次报道了若尔盖高原湿地氨氧化微生物的多样性和系统发育地位, 仅检测到 AOA 的存在, 没有扩增到 AOB *amoA* 基因, 说明在若尔盖高原湿地氨氧化微生物以 AOA 为主, 氨氧化过程主要由 AOA 驱动。这一研究结果是对 AOA 生物地理分布及高原湿地氮循环研究的一个重要补充。但是, AOA 在高原湿地中的生态功能并不清楚, 需要进一步研究。

参考文献

- [1] He J, Zhang L. Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(1): 406-415. (in Chinese)
贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展. *生态学报*, 2009, 29(1): 406-415.
- [2] Kowalchuk GA, Stephen JR. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55(1): 485-529.
- [3] Molina V, Ulloa O, Farías L, Urrutia H, Ramírez S, Junier P, Witzel KP. Ammonia-oxidizing β -Proteobacteria from the oxygen minimum zone off Northern Chile. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(11): 3547-3555.
- [4] Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437(7058): 543-546.
- [5] Jia Z, Weng J, Liu X, Conrad R. Microbial ecology of archaeal ammonia oxidation—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(4): 431-437. (in Chinese)
贾仲君, 翁佳华, 林先贵, Ralf Conrad. 氨氧化古菌的

- 生态学研究进展. 微生物学报, 2010, 50(4): 431-437.
- [6] Zheng C, Wang G. Research progress on main functional microorganisms in wetland ecosystems. *Wetland Science*, 2012, 10(2): 243-249. (in Chinese)
郑春雨, 王光华. 湿地生态系统中主要功能微生物研究进展. 湿地科学, 2012, 10(2): 243-249.
- [7] Niu J, Zhou X, Jiang N, Wang Y. Characteristics of soil microbial communities under dry and wet condition in Zoige alpine wetland. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(2): 474-482. (in Chinese)
牛佳, 周小奇, 蒋娜, 王艳芬. 若尔盖高原寒湿地干湿土壤条件下微生物群落结构特征. 生态学报, 2011, 31(2): 474-482.
- [8] Zhang K, Chen Q, Zhao K, Wang W, Zhu X. 16S rDNA PCR-RFLP analysis and phylogeny of bacteria isolated from swamp and meadow aeolian soils in the Zoige Plateau, Sichuan, China. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(12): 3254-3260. (in Chinese)
张可, 陈强, 赵珂, 王文跃, 朱雪梅. 若尔盖高原沼泽土和草甸风沙土细菌 16S rDNA PCR-RFLP 和系统发育分析. 生态学报, 2010, 30(12): 3254-3260.
- [9] Xiang S, Guo R, Wu N, Sun S. Current status and future prospects of Zoige Marsh in Eastern Qinghai-Tibet Plateau. *Ecological Engineering*, 2009, 35(4): 553-562.
- [10] Dong Z, Hu G, Yan C, Wang W, Lu J. Aeolian desertification and its causes in the Zoige Plateau of China's Qinghai-Tibetan Plateau. *Environmental Earth Sciences*, 2010, 59(8): 1731-1740.
- [11] Tang J, Xu Q, Wang L, Ding X, Tang B, Wu L, Feng S, Sun Q, Yang Z, Zhang J. Soil bacterial community diversity under different stages of degradation in zoige wetland. *Microbiology China*, 2011, 38(5): 677-686. (in Chinese)
唐杰, 徐青锐, 王立明, 丁祥, 汤博, 吴俐莎, 冯甦, 孙群, 杨志荣, 张杰. 若尔盖高原湿地不同退化阶段的土壤细菌群落多样性. 微生物学通报, 2011, 38(5): 677-686.
- [12] Zhang G, Tian J, Jiang N, Guo X, Wang Y, Dong X. Methanogen community in Zoige wetland of Tibetan plateau and phenotypic characterization of a dominant uncultured methanogen cluster ZC-I. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(7): 1850-1860.
- [13] Francis CA, Beman JM, Kuypers MMM. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal*, 2007, 1(1): 19-27.
- [14] Beman JM, Francis CA. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahia del Tobarí, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(12): 7767-7777.
- [15] 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.
- [16] Park HD, Wells GF, Bae H, Criddle CS, Francis CA. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5643-5647.
- [17] 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.
- [18] Hui L, Zhao J, Wu L, Shao Y, Li J, Zhu B. Community structure of ammonia-oxidizing prokaryotes at the dry-up lake in Huitengxile grassland. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(1): 104-113. (in Chinese)
惠丽华, 赵吉, 武琳慧, 邵玉琴, 李靖宇, 朱兵. 辉腾锡勒草原干涸湖泊中氨氧化微生物群落结构分析. 微生物学报, 2012, 52(1): 104-113.
- [19] Peng C, Jiang H, Huang L, Hou W, Yang J, Wang S, Huang Q, Deng S, Dong H. Abundance and diversity of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in cold springs on the Qinghai-Tibet Plateau. *Geomicrobiology Journal*, 2013, 30(6): 530-539.
- [20] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [21] Agogué H, Brink M, Dinasquet J, Herndl GJ. Major gradients in putatively nitrifying and non-nitrifying archaea in the deep North Atlantic. *Nature*, 2008, 456(7223): 788-791.
- [22] Huang L, Jiang H, Wang S, Zhang C, Dong H. Structure of planktonic ammonia-oxidizing community in the waters near the Three Gorges Dam of the Yangtze River. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(1): 83-90. (in Chinese)
黄柳琴, 蒋宏忱, 王尚, 张传伦, 董海良. 长江三峡大坝两侧水体中氨氧化微生物种群结构分析. 微生物学

报, 2011, 51(1): 83-90.

- [23] Ye L, Zhu G, Wang Y, Feng X, Wang W, Wang S, Yin C. Abundance and biodiversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in littoral wetland of Baiyangdian Lake, North China. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(8): 2209-2215. (in Chinese)

叶磊, 祝贵兵, 王雨, 冯晓娟, 王为东, 王衫允, 尹澄

清. 白洋淀湖滨湿地岸边带氨氧化古菌与氨氧化细菌的分布特性. *生态学报*, 2011, 31(8): 2209-2215.

- [24] Erguder TH, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(5): 855-869.

Diversity of ammonia-oxidizing archaea in Tibetan Zoige plateau wetland

Youkun Zheng^{1,2}, Xianbin Wang¹, Yunfu Gu^{1*}, Xiaoping Zhang¹

¹College of Environmental and Resource Science, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan Province, China

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

Abstract: [**Objective**] Investigation of ammonia-oxidizing archaea (AOA) in nature environments is important to understand the global nitrogen cycling. However, little is known about the AOA community in plateau wetland. Therefore, we studied the composition and diversity of AOA in Zoige plateau wetland swamp soil. [**Methods**] Total DNA was extracted from the swamp soil of three typical wetlands including A'xi pastoral area, Maixi pastoral area and Fenqu pastoral area locate in Zoige plateau wetland, and *amoA* gene was amplified with universally AOA *amoA* gene primers and then cloned. Then 80 positive clones for each clone library were chosen for further restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, and the typical RFLP types were selected for sequencing and clustered into operational taxonomic units (OTUs) at 98% cutoff using the Mothur software. The MEGA 5.0 software was used for the *amoA* gene phylogeny analysis. [**Results**] A total of 240 positive clones for all 3 libraries were used for RFLP analysis, and 15 specific *amoA* sequences were sequenced and clustered into 7 OTUs at 98% cutoff. Among them, OTU6 was detected in all of the 3 libraries and included 27% of the total specific clones. The phylogeny analysis showed that the 15 *amoA* sequences were grouped into 3 subgroups consisted of Zoige Wetland Clade 1 (4 OTUs), Zoige Wetland Clade 2 (2 OTUs) and Zoige Wetland Clade 3 (1 OTU). BLAST analysis showed that all OTUs were affiliated with the phylum Crenarchaeota. Correlation analysis showed that the Shannon diversity index (H') was significantly correlated with ammonia, nitrate/nitrite ($P < 0.05$). [**Conclusion**] AOA in the Zoige plateau wetland swamp soil are all belonged to the Crenarchaeota, and their diversity is significantly correlated with soil ammonia, nitrate/nitrite content.

Keywords: Zoige wetland, ammonia-oxidizing archaea (AOA), *amoA* gene, diversity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (D010504), by the Sichuan Natural Science Foundation (SC200902158) and by the Sichuan Agricultural University (01470702)

* Corresponding author. Tel: +86-28-86290982; E-mail: gungyf@163.com

Received: 10 December 2013/Revised: 23 January 2014