



基于数据库分析不同类型生境中厌氧氨氧化细菌的多样性分布特征

洪义国^{1,2*}, 黄天政¹, 李益本¹, 吴佳鹏¹, 焦黎静¹, 崔明超²

¹广州大学大湾区环境研究院, 广东 广州 510006

²广州大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510006

摘要:【目的】厌氧氨氧化过程是一种能在厌氧条件下氧化 NH_4^+ 同时还原 NO_2^- 或者 NO_3^- 生成 N_2 的过程, 是氮素循环过程的重要途径之一。厌氧氨氧化过程由厌氧氨氧化细菌催化完成, 目前通过分子生物学的手段已证实了厌氧氨氧化细菌存在于多种类型的生境中, 本文对厌氧氨氧化细菌在不同类型生境中的多样性分布规律进行了系统分析。【方法】基于 NCBI 数据库中厌氧氨氧化细菌的 16S rRNA 基因序列, 利用 Mothur 分析平台系统分析了厌氧氨氧化细菌在不同生境中的多样性分布规律和特征。【结果】分析表明, 海洋环境中 *Ca. Scalindua* 属的厌氧氨氧化细菌占绝对主导; 淡水和农业土壤中 *Ca. Brocadia* 属的厌氧氨氧化细菌占优势; 工程系统中普遍存在 *Ca. Brocadia* 和 *Ca. Kuenenia* 属的厌氧氨氧化细菌; 而湿地和河口环境中厌氧氨氧化细菌多样性最高, *Ca. Scalindua*、*Ca. Brocadia* 和 *Ca. Kuenenia* 属的厌氧氨氧化细菌均有较高的相对丰度, 显示出了陆地与海洋交汇的显著特征。【结论】本研究系统展示了不同的生境中厌氧氨氧化细菌的多样性群落结构生境分布特征, 表明环境特征差异直接影响了厌氧氨氧化细菌的种群分布和系统演化。

关键词: 厌氧氨氧化细菌, 数据库, 多样性, 生境, 群落结构

氮素循环是自然生态系统中的一种重要的物质循环过程, 是由微生物代谢驱动的多种生物化学反应所组成^[1]。一直以来, 反硝化过程 (Denitrification) 被认为是生态系统中无机氮去除的唯一生物地球化学途径。1977 年, 理论化学家

Broda 通过热力学定律推导得出在没有 O_2 参与的情况下, NH_4^+ 能被 NO_3^- 或者 NO_2^- 氧化生成 N_2 , 并预测自然环境中存在驱动该反应发生的微生物^[2]。直到 1995 年, Delft 大学的研究者在一个厌氧反应器里发现 NH_4^+ 和 NO_2^- 会同时减小并产生

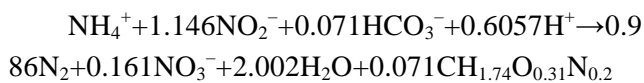
基金项目: 国家自然科学基金(31870100, 41576123, 91851111); 广州大学百人计划人才引进启动基金(GZHU-B-05)

*通信作者。Tel/Fax: +86-20-39158007; E-mail: yghong@gzhu.edu.cn

收稿日期: 2018-09-14; 修回日期: 2018-11-13; 网络出版日期: 2019-02-18

N_2 的现象,首次证实了厌氧氨氧化过程(Anaerobic Ammonium Oxidation, 简称 Anammox)的存在^[3]。Anammox 过程被证实后,科学家们对参与 Anammox 过程的细菌的种类、生理特性及其基因组结构进行了深入研究^[4-7]。2002 年,有研究指出在海洋生态系统中 Anammox 过程贡献了 24%–60% 的 N_2 产量^[8],说明了在自然环境中 Anammox 过程对氮循环有着重要的作用。大量研究表明,厌氧氨氧化细菌(Anammoxers)在多种类型生态系统的缺氧环境中都有广泛分布,如海洋生态系统^[9]、淡水生态系统^[10]和陆地生态系统^[11]。另外,在极端的生态环境中也发现了 Anammoxers 的存在,如热液喷泉口^[12]、高盐盆地^[13]、海冰^[14]、多年冻土^[15]和油田^[16]等。

Anammox 是氮循环过程中一个重要的氮素去除的途径,是在厌氧条件下以 NO_2^- 为电子受体氧化 NH_4^+ 直接反应生成 N_2 的过程。在工程应用上,由于 Anammox 过程可以节省 60% 的 O_2 消耗量,减少 90% 的污泥产量且不需要有机物作为电子供体,所以目前在全球范围内 Anammox 已经发展成为一种高效节能的脱氮工艺,广泛应用于全球 110 多个污水处理厂^[7]。然而驱动 Anammox 反应的细菌目前还不能纯培养,因此目前研究 Anammox 过程主要依赖分子生物学方法,利用基因测序手段,从基因层面去分析其多样性以及与环境因素的关系。有关 Anammox 反应过程的化学计量方程首次在 1998 年被提出,并在 2014 年通过对高度富集培养的 Anammoxers 的研究进行了重新修订^[4]:



基于 16S rRNA 基因序列的相似性分析, Anammoxers 在系统进化上隶属于浮霉状菌门

(Planctomycete)^[17], 主要包括 5 个属,分别是 *Ca. Kuenenia*, *Ca. Brocadia*, *Ca. Anammoxoglobus*, *Ca. Jettenia* 和 *Ca. Scalindua* (*Ca.* 为 *Candidatus* 的简写)。其中 *Ca. Brocadia*、*Ca. Kuenenia* 和 *Ca. Anammoxoglobus* 一般在淡水生态系统中被发现^[18], 而 *Ca. Scalindua* 通常在高盐度的环境中为优势属^[19], 同时也有部分 *Ca. Scalindua* 种群在淡水环境中被发现,如污水处理厂^[20]和稻田土^[21], 说明 *Ca. Scalindua* 的分布同时会受盐度以外的其它环境因素的影响。已有研究表明, *Ca. Jettenia caeni* 的活性即使在盐度很低的环境中也会受到抑制^[22]。另外 *Ca. Brocadia sinica* 倾向于在较高浓度 NH_4^+ 和 NO_2^- 的环境中存在,因为它对 NH_4^+ 和 NO_2^- 有较高的亲和力^[34]。以上研究表明,这 5 个属的 Anammoxers 在不同生态环境中有不同的多样性分布特点。然而先前 Anammoxers 多样性分布的研究都是各自独立的分析,都是以单一类型生境作为研究的区域,而对于地球生态系统当中不同类型生境之间 Anammoxers 多样性的总体分布特征尚不清晰。本研究基于对 NCBI 数据库已有的 Anammoxers 的 16S rRNA 基因序列,综合分析了不同类型生境中 Anammoxers 的多样性分布特征,并揭示环境主导因素对不同类型生境中 Anammoxers 的系统演化的作用以及与 Anammoxers 种群结构之间的关系。

1 材料和方法

1.1 数据收集与整理

本研究收集了近 20 年来发表的与 Anammoxers 在不同生境中多样性分布研究的相关文献,根据文献中公布的 Anammoxers 的 16S rRNA 基因的序列号(部分序列直接来自数据库),

在美国国立生物技术信息中心(NCBI)基因数据库中下载相关基因序列。总共收集了 12614 条序列, 这些序列来自全球不同的研究区域和不同类型的生境。根据相应文献中的具体采样点把这些序列分成八个典型生境类型(不同生境的参考文献见附件), 分别为海洋生境(Marine habitat)(南海、氧气最小层、太平洋、渤海、Okhotsk 海、纳米比亚上升流、海绵以及深海热液等, 共计参考 21 篇文献), 淡水生境(Freshwater habitat)(东江、Tanganyika 湖、Rassnitzer 湖、Kitanra 湖、高山湖、太湖、新义河、Grany 河、钱塘江等, 共计参考 17 篇文献), 河口生境(Estuarine habitat)(包括日本海、Chesapeake Bay、珠江口、长江口、胶州湾以及 Cape Fear 河口等, 共计参考 14 篇文献), 农业土壤生境(Agriculture soil habitat)(包括水稻土、森林土、根际土、含水土层、农业土壤等, 参考 15 篇文献), 湿地生境(Wetland habitat)(滨海湿地、城市湿地、河岸带、盐沼湿地、红树林湿地、自然保护区湿地、人工湿地, 共计参考 10 篇文献), 反应器生境(Reactor habitat)(包括多种类型的废水生物反应器, 共计参考文献 32 篇), 污水厂生境(WWTP habitat)(参考 10 篇文献), 和其它生境(Other habitat)(包括油田, 生物滤池以及虾池等, 参考文献 6 篇)。其中淡水生境包括了湖泊、河流水体及沉积物, 湿地生境包括了内陆湿地以及海岸带湿地, 农业土壤生境包括施加氮肥的水稻土及其他农业土壤, 反应器生境主要指实验室用于研究的小型生物反应器, 污水厂生境是指城市污水处理厂中利用生物反应去除城市污水中无机氮的生物反应池。本研究收集的 Anammoxers 的 16S rRNA 基因序列涵盖了全球不同地区的不同类型生境, 因而能够从宏观上分析不同环境因子主导

的厌氧氨氧化细菌的多样性分布规律。

对于从 NCBI 上收集的部分有质量问题的序列(比如碱基缺失和错位), 在序列分析前需要把这些问题序列去除, 以免影响结果分析。另一方面, 由于这些基因序列是来自不同学者的个案研究, 使用的引物和测序方法都有所不同, 导致了不同研究获得的基因序列所覆盖 16S rRNA 基因的范围都会有所差别。为了能够有效比较序列之间差异性, 同时使这些序列能够与我们建立的参考数据库中的序列能够相匹配, 需要把这些基因序列统一截取到某一相同位置的片段, 把截取后少于 100 个碱基的序列去除。截取后的序列长度约为 455 bp, 所有序列片段涵盖了 Amx368F/820R 或者 Amx438F/684R 引物对扩增的片段之内。因为这 2 对引物都被广泛应用于厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因分析, 因此截取后的基因片段可以用于厌氧氨氧化细菌的生态分布的分析。

1.2 Anammoxers 参考数据库的建立

从 GenBank 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)中下载 21 条具有确切种属鉴定的厌氧氨氧化菌的 16S rRNA 基因序列, 并作为种子序列。同时在 GenBank 数据库中下载并获得 3935 条环境样品的厌氧氨氧化菌的 16S rRNA 基因序列, 将获得的全部序列进行整合, 利用 Mothur 软件(https://mothur.org/wiki/MiSeq_SOP)对序列进行处理: (1) 以种子序列作为参比序列, 进行序列对齐; (2) 对环境样品序列进行去冗余, 提取非冗余序列; (3) 对序列进行长度控制, 删除长度小于 200 个碱基的序列; (4) 对剩余序列进行嵌合体检测, 去除含有嵌合体片段的序列; (5) 利用筛选处理后的序列生成基因序列文件(Template file), 同

时, 基于序列号在 NCBI 数据库中搜集各序列对应的种属信息, 并利用 MEGA 7 构建系统进化树, 对数据库种属信息进行确认及修正, 生成最终的种属信息文件(Taxonomic file)。最后, 整合生成的参考文件及种子序列文件信息, 生成包含 2943 条序列的厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因参考数据库 (Anammoxers Reference Database, ARD)。此参考数据库包含 16S rRNA 基因序列文件和种属信息文件, 序列处于 368–820 之间。

1.3 利用 Mothur 软件分析厌氧氨氧化细菌的多样性

1.3.1 不同生境之间的显著性差异分析: 把所收集的基因序列按照八种生境分成 8 个序列文库。为进一步确认不同生境基因文库之间所产生的差异是真实存在还是因为偶然抽样误差所造成, 进一步对 8 个文库之间的显著性差异进行分析。本研究使用 Mothur 程序中的 Libshuff 命令分析这 8 个序列文库之间的序列组成差异, 具体分析流程如下: 设显著水平值为 0.05, 将 8 个序列文库进行两两比较, 共计得到 56 个比较组, 如果两者之间的 Libshuff P 值 P_{xy} 和 P_{yx} 都小于 0.0008928 (0.05/56), 则表示这 2 个文库存在显著性差异; 如果 P_{xy} 值很小而 P_{yx} 值很大, 则表示 Y 是 X 的子集; 如果 P_{xy} 和 P_{yx} 值都大于 0.0008928, 则表示这 2 个文库不存在显著性差异。(X 和 Y 代表 2 个进行比较的生境序列文库)。

1.3.2 不同生境 Anammoxers 的 α 多样性分析: 运用 Mothur 程序分析不同生境的 8 个序列文库的多样性指数。绘制序列文库的稀释曲线, 得出代表各个生境序列的多样性覆盖程度。通过 Mothur 程序把不同生境中的序列以 80% 的阈值(cutoff value), 以建立的 Anammoxers 参考数据库(RDA)为基准进行种

属归类, 得出不同生境中 Anammoxers 在属分类水平上的相对丰度。为了进一步研究 Anammoxers 主要种属在不同生境中的分布, 通过 Mothur 程序以 97% 的相似性把序列分型成不同 OTU (Operational Taxonomic Unit), 在 OTU 水平上进行热图分析(Heatmap analysis), 并利用 MEGA 软件建立进化树, 分析 Anammoxers 的主要种属在不同生境中的分布。

1.3.3 不同生境 Anammoxers 的 β 多样性分析: 通过 Mothur 程序的主坐标分析法(PCoA)分析 Anammox 细菌在这不同生境之间的分布规律。由于每个生境的序列总数不一样, 为了使相异性矩阵是由相同序列的序列库所产生, 需要把代表各个生境的序列进行稀释。本次研究在进行 PCoA 分析前先把每个生境的序列文库稀释成以 250 条序列数为基准的序列亚文库进行分析, 稀释之后共分成 46 个亚文库, 然后利用 Mothur 的 PCoA 程序进行序列分析, 得到 Anammoxers 在不同生境之间的分布关系。

2 结果和分析

2.1 厌氧氨氧化细菌在不同类型生境中的多样性指数

通过 Mothur 的 Libshuff P 值分析得出 8 个生境的序列文库之间的显著性差异数值。这 8 个生境序列文库之间大部分都存在显著性差异(P_{xy} 或 P_{yx} 都小于 0.0008928), 而部分序列文库之间存在包含与被包含的关系。因为淡水、湿地和“其它”这 3 个生境的 P_{yx} 值较大, 表明这 3 个生境的序列中涵盖的多样性信息可能包含于河口生境序列的信息当中, 是河口环境的一个子集。在该显著性差异分析中, 没有出现生境序列文库

之间无显著性差异的组别, 这说明了这 8 个生境的分组序列文库能够用于多样性的差异分析和比较。

不同生境的 Anammoxers 的 16S rRNA 基因多样性指数见表 1。从表 1 可知每个生境所收集到的序列数量有显著不同, 这表明以往对 Anammoxers 在生境中多样性的研究的主要区域有偏向性, 以往的研究人员主要关注河口和湿地等环境因素复杂的生态系统以及海洋等自然生态系统。从 Coverage 指数可知, 除了“其它”这一组它的覆盖指数比较低以外, 剩余 7 个生境的覆盖指数都接近 0.99 至 1.00, 表明收集的序列能够较充分反映该生境中 Anammoxers 的物种多样性特征。而“其它生境”这组由剩余的 171 条序列所组成, 不能代表某一生境的特性, 因此在后续分析当中不考虑分析这一序列组的多样性, 主要关注其余 7 个特征明显的生境类型。

从表 1 的多样性指数可以看出, 不同生境中的 Anammoxers 的多样性结构的差别。反应器的 Simpson 指数比其余生境都要大, 表明在反应器中存在某些生态优势度高的 Anammoxers 种属, 多样性较低。同时, 这进一步说明了在人为环境因

素主导的反应器生境中和在自然生境中的 Anammoxers 种属演化和分布是有显著的不同。虽然农业土壤生境中包含的基因序列数较多, 但其聚类得到的 OTU 数目却少于淡水生境, 其 Chao1 指数也低, 表明农业土壤中 Anammoxers 物种的多样性较低, 某个种属在农业土壤生境中占据绝对优势。另外, 湿地生境的 Chao1 和 Shannon 指数相对比较高, 说明其 Anammoxers 种属多样性较高; 然而, 其 Evenness 指数低于其它生境, 表明湿地环境中种属具有较高的均一性, 间接反映了湿地生态系统的环境复杂性。淡水和海洋生境的 Simpson 指数都高于河口和湿地生境, 表明受人类活动影响较大的河口和湿地生境中 Anammoxers 物种多样性要高于淡水和海洋生境, 进一步说明了河口和湿地是一个环境复杂的生态系统, 具有海洋和陆地混合的显著特征。

图 1 给出了不同生境序列文库的稀释曲线。可以看出, 不同的生境包含的序列数有较大的差异, 以河口和湿地的序列数最多。除了“其他”这个生境类型, 其余 7 个生境的 OTU 基本都到了平台期, 表明这些序列可以反映这些生境中的 Anammoxers 多样性。

表 1. 不同生境厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因序列的多样性指数

Table 1. Diversity index of Anammoxers 16S rRNA gene sequences in different habitat

Habitat	Total sampled sequences	Total analyzed sequences	OTU	Chao1	Simpson	Shannon	Evenness*	Coverage
Agricultural soil	1599	1141	85	98.8	0.03	3.62	0.82	0.98
Estuary	4183	3433	235	243.9	0.02	4.48	0.82	0.99
Freshwater	933	721	97	115.1	0.04	3.74	0.82	0.96
Marine	1985	1564	115	122.8	0.03	3.90	0.82	0.99
Wetland	2660	2265	198	219.1	0.02	4.47	0.56	0.98
Reactor	530	398	28	35.0	0.14	2.42	0.73	0.98
WWTP	533	339	31	37.0	0.05	2.95	0.87	0.99
Others	191	171	39	59.0	0.06	2.98	1.22	0.88

*Evenness=Shannon/OTU.

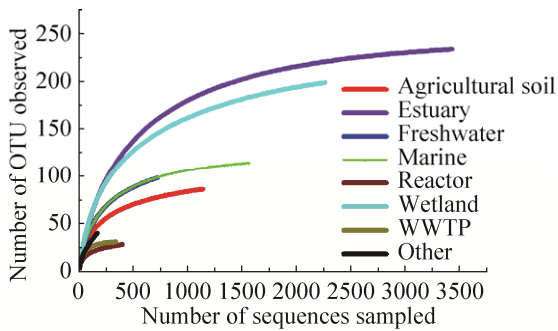


图 1. 不同生境中厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因序列多样性的稀释曲线

Figure 1. Rarefaction curves of the Anammoxers 16S rRNA gene sequences in different habitat.

2.2 不同类型生境中厌氧氨氧化细菌的种属组成

图 2 是基于序列分类得到的 Anammoxers 5 个属在不同生境中的分布图。农业土壤生境中以 *Ca. Brocadia* (72.3%) 和 *Ca. Kuenenia* (22.8%) 为主，同时还有少量的 *Ca. Anammoxoglobus*，但没有发现 *Ca. Scalindua* 的存在。而海洋生境中 *Ca. Scalindua* 占绝对主导地位，达到 98.4%，说明 *Ca. Scalindua* 适于在海洋高盐环境中生存。河口生态系统是陆

地淡水和与海水的混合区域，其中 *Ca. Scalindua* 占了 68.7%，其余的是 *Ca. kuenenia* 和 *Ca. Brocadia*，没有发现 *Ca. Anammoxoglobus* 和 *Ca. Jettenia*。另外，湿地作为与淡水、海洋和土壤都相关的复合的生态系统，其 Anammoxers 的分布特征与河口生境表现出相似的特征，表明湿地和河口生境具有相似的环境条件。另外，污水厂和反应器这两个工程生态系统中 Anammoxers 种属具有相似分布特征，主要为 *Ca. Brocadia*、*Ca. Jettenia* 和 *Ca. Kuenenia*，说明这三个属的 Anammoxers 可以在反应器和污水厂等受人类活动影响较大的人工构建的生境中生存。但是反应器本省也具有多种不同的类型，不同类型反应器的环境条件对 Anammoxers 多样性分布的影响还有待于做进一步的研究。*Ca. Jettenia* 普遍存在于反应器、污水厂、和农业土壤等受人为活动影响较大的生境中，但不会出现在高盐度的自然生境中，这说明 *Ca. Jettenia* 可能不适合生存在盐度较高的环境中，相关问题需要在未来的研究中做深入探索。

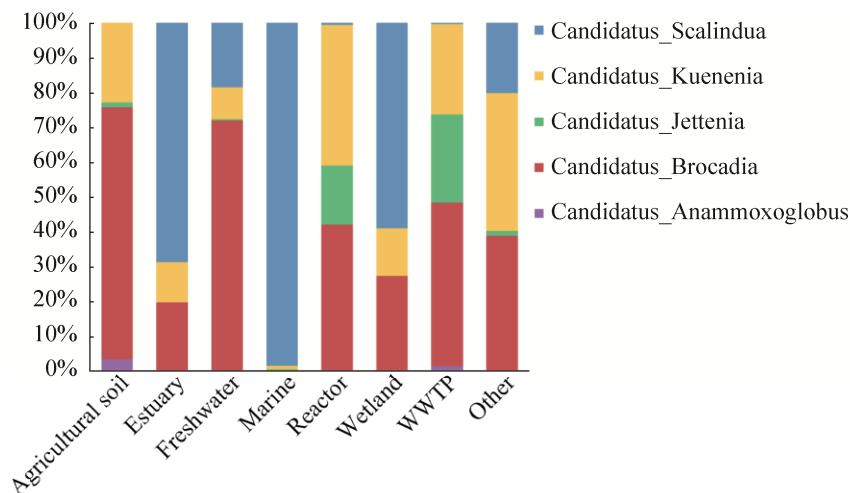


图 2. 不同生境中厌氧氨氧化细菌在属水平上的组成

Figure 2. Community composition of Anammoxers in different habitat on genus level.

为了进一步分析 Anammoxers 在不同生境中的分布规律, 在 OTU 水平上进行了更深入分析。图 3 和图 4 分别是基于所研究的所有生境中丰度较大的前 20 个 OTU 所得到的热图(Heatmap)和系统进化树。从图 3 和图 4 中可以看出, Anammoxers 在不同类型生境中的分布规律是不同的。OTU-01 在反应器和污水厂中是优势种, 在进化树上和 *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* 相近, 而隶属于 *Ca. Brocadia* 的 OTU 物种虽然占比较低但也出现在反应器和污水厂中, 但这些 *Ca. Brocadia* 应当是工程环境内特有的种属, 与自然生态系统中普遍存在的 *Ca. Brocadia* 有所不同。OTU-05 在河口生境中的丰度最高, 其次是 OTU-03 也有较高的丰度。根据进化树的分析, OTU-05 和 OTU-05 分别归属于 *Ca. Scalindua* 和 *Ca. Kuenenia*。在海洋环境中 OTU-08 的丰度最高, 进化树分析它归属于 *Ca. Scalindua* 属。虽然海洋和河口生境中都普遍存在 *Ca. Scalindua*, 但海洋的优势种 OTU-08 与河口的优势种 OTU-05 在进化树上属于 *Ca.*

Scalindua 的不同分支内, 表明河口和海洋中存在不同 *Ca. Scalindua* 种, 这种群落结构的差异可能是由于河口和海洋环境的差异而导致的。在淡水生境中, OTU-06 丰度最高, 进化树上归属于 *Ca. Brocadia* 属, 而且也发现有少量 *Ca. Scalindua* OTU 的存在, 但与海洋和可口中的 *Ca. Scalindua* 的 out 有所不同, 表明在淡水生境中存在自身环境相适应的独特的物种。湿地环境的 Anammoxers 的种属分布相对均匀, 前 20 个高丰度的 OTU 在湿地生境中都含有一定的丰度, 说明了湿地环境是 Anammoxers 多样性较高的环境。在农业土壤中, OTU-14 和 OTU-10 的相对丰度较高, 它们归属于 *Ca. Brocadia* 属。另外, 属于 *Ca. Kuenenia* OTU-01 在农业土壤中也占有一定的丰度。而在其中存在的 OTU18, 在进化上无法归入目前被鉴定的 Anammoxers 的 5 个属, 推测它可能是代表了 1 个未知的物种, 这种物种可能是受农业土壤受肥料的高氨氮物质的影响。

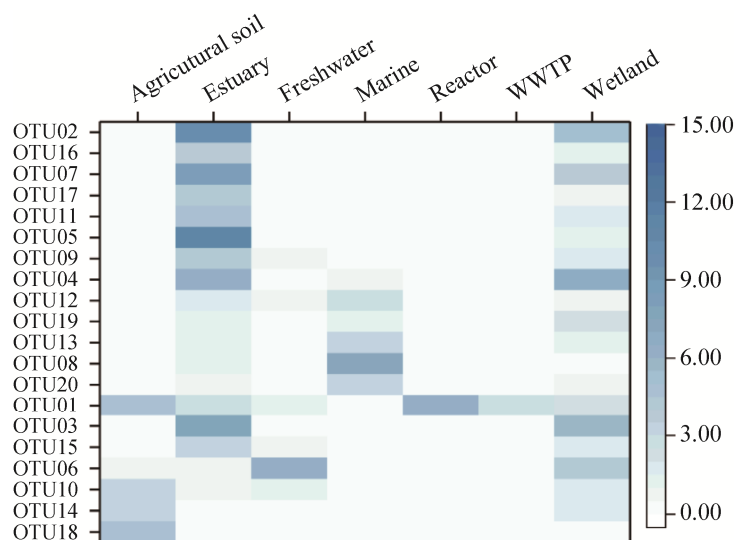


图 3. 较高丰度的厌氧氨氧化细菌序列 OTU 在不同生境中的热图
Figure 3. Heatmap of dominant OTU of Anammoxers in different habitat.

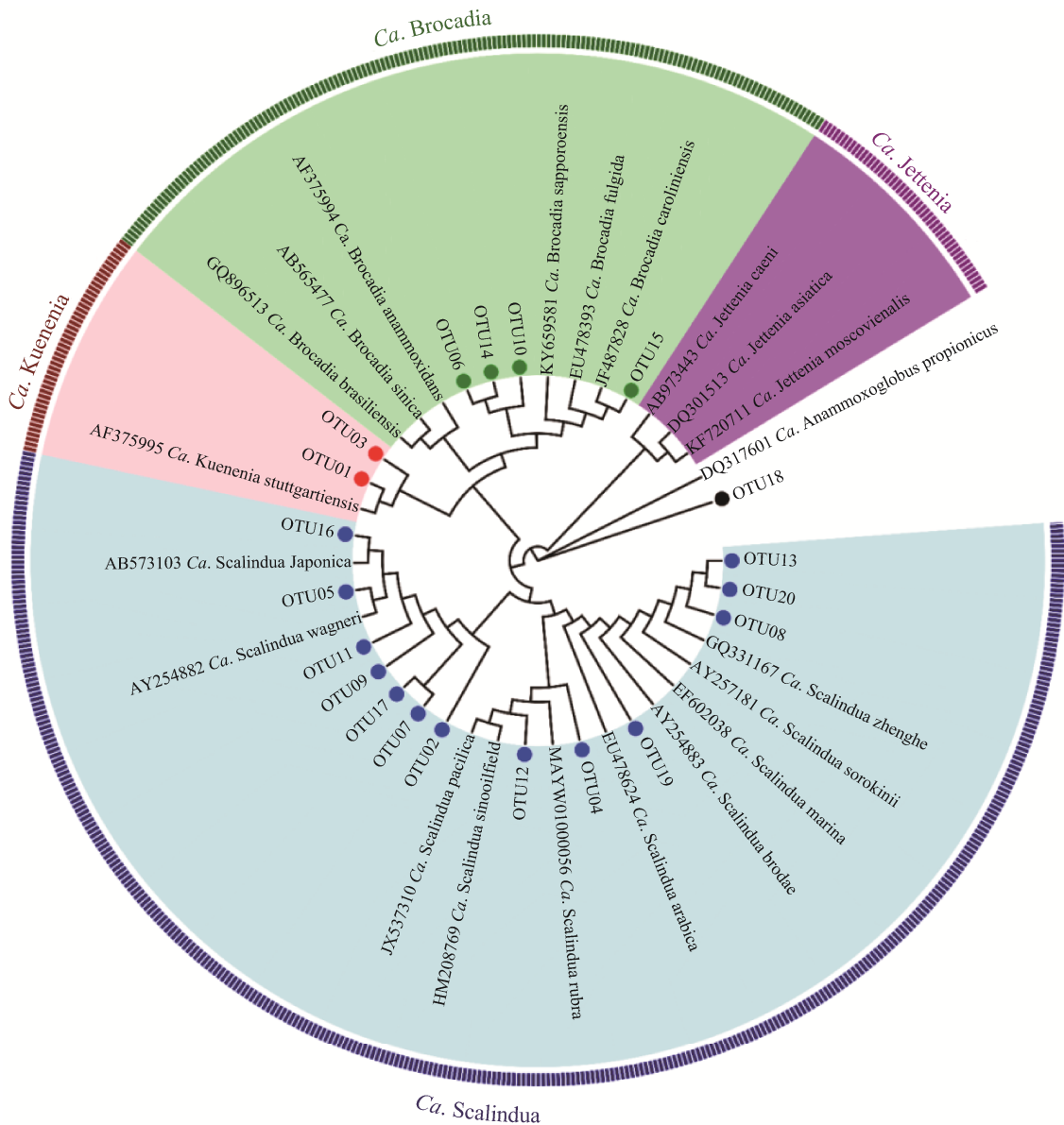


图 4. 厌氧氨氧化细菌(TOP 20 OTUs)的系统进化树分析
 Figure 4. Phylogenetic analysis of dominant OTU of Anammoxers.

2.3 不同类型生境中厌氧氨氧化细菌的种属分布差异

为了更好的阐明 Anammoxers 在不同典型生境之间的分布规律，本次研究以 Anammoxers 的 16S rRNA 基因序列经过 Mothur 程序分析得到 PCoA 坐标图(图 5)。从图 5 可以看出，河口、海洋和农业土壤生境的样品各自都有显著的分

离，表明在这 3 种生境中 Anammoxers 呈现出不同的群落结构组成。淡水生境的样品和反应器以及农业土壤样品距离相近，说明 Anammoxers 在淡水和反应器环境中的分布规律与在农业土壤中相近。但其中有 1 个淡水样品点有明显分离，说明 Anammoxers 在部分淡水环境中也有其相对不同的群落结构组成。海洋生境中的样品点几乎都

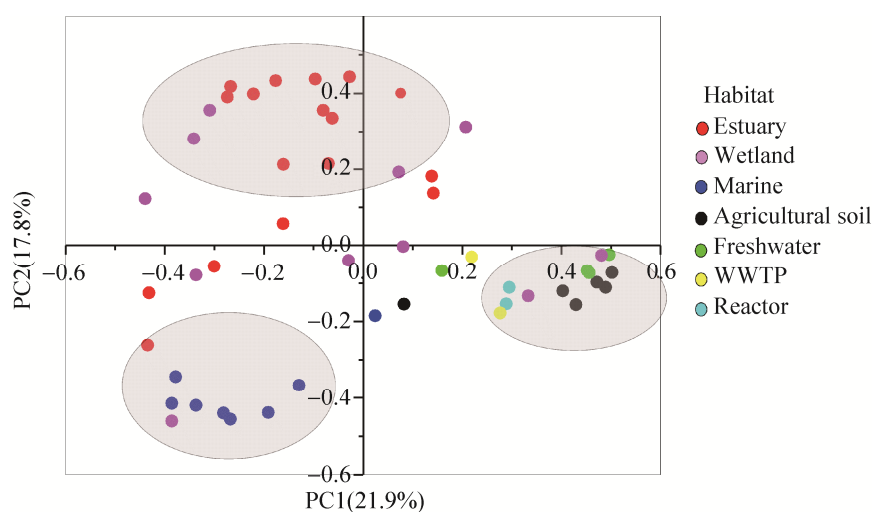


图 5. 基于厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因序列多样性的不同生境间的主坐标分析

Figure 5. Principal coordinate analysis (PCoA) for each habitat based on the anammoxers 16S rRNA gene sequences.

聚类在一起, 说明了 Anammoxers 在海洋环境中的组成相对一致。然而, Anammoxers 在河口环境中也表现出明显不同的特征, 有的样品点与淡水的样品接近, 而有些样品点与海洋的样品接近, 进一步表明了河口生境中的 Anammoxers 的结构具有淡水与海水生境混合的特征。湿地生境的样品点表现出分散的分布特点, 与海洋、土壤、淡水和河口的样品都有接近, 表明湿地环境中的 Anammoxers 的多样性组成特征, 同时也反映了了湿地生境是一个相对复杂的生态环境系统。

2.4 不同生境的环境因素与厌氧氨氧化菌种群结构的关系

上述结果表明, Anammoxers 在不同类型生境中的多样性分布具有明显的差异。这种差异应当是适应不同生境中的不同的环境因素长期进化的结果, 演化出适应特定环境的优势种属, 导致不同类型的生境中 Anammoxers 种群结构的不同。海洋环境当中主要存在 *Ca. Scalindua*, 说明 *Ca.*

Scalindua 适于在高盐度的环境下生存。已有研究表明, 在实验室反应器的高盐浓度条件下的富集培养过程中, Anammoxers 群落结构逐渐从 *Ca. Kuenenia* 为优势演化为以 *Ca. Scalindua* 占优势^[23], 进一步说明了盐分影响了 Anammoxers 的群落结构的演替。虽然 Anammoxers 丰度随盐度的上升而增加^[24], 但是 Anammoxers 的活性却与盐度成负相关^[25]。因此还需要更多的研究把盐度和其它环境因素进行综合分析, 才能更精确的理解 Anammoxers 受盐度的影响效应, 例如海水深度和温度^[26]。另一方面, 为了研究 *Ca. Scalindua* 能够适应海洋环境的机制, 已有研究通过宏基因组的对比分析得出 *Ca. Scalindua* 能够表达一种对 NH_4^+ 和 NO_2^- 高亲和力的蛋白质, 使其能够适应缺少 NH_4^+ 和 NO_2^- 的海洋环境。此外, 还有研究表明 *Ca. Scalindua* 能够矿化海洋环境中的有机酸作为 NH_4^+ 的来源^[27]。

淡水环境中 *Ca. Brocadia* 属的厌氧氨氧化菌

占据优势地位^[28-29]。然而在地下水的研究中,却发现 *Ca. Kuenenia*、*Ca. Jettenia* 和 *Ca. Scalindua* 属的 Anammoxers^[30],这可能是由于地下水的环境与一般淡水环境有显著的不同,但有关在地下水环境的 Anammoxers 的多样性分布及代谢功能的研究还非常少。

在农业土壤生境中,除了 *Ca. Scalindua*, 其它的 4 个种属都有存在,其中 *Ca. Brocadia* 和 *Ca. Kuenenia* 丰度最高。土壤的深度、营养盐浓度、氧气含量和 pH 都会影响 Anammoxers 在土壤中的多样性分布^[31-32]。

反应器和污水厂这 2 个工程生态系统中主要存在 *Ca. Brocadia* 和 *Ca. Kuenenia*, 其中 *Ca. Brocadia* 占据优势。但工程系统中的大部分的 *Ca. Brocadia* 在系统进化上与其他生境的 *Ca. Brocadia* 有显著的不同。先前的研究表明, *Ca. Brocadia sinca* 在工程系统中比 *Ca. Kuenenia stuttgartienis* 有更强的适应性,因为 *Ca. Brocadia sinca* 对 NH_4^+ 和 NO_2^- 有着更强的亲和性,对氧气有更高的耐受力,其生长速度也较快^[33]。也有研究表明,在不稳定的浓度波动的 NO_2^- 环境下进行富集培养,以 *Ca. Brocadia* 为主的菌群逐渐演化成以 *Ca. Kuenenia* 为主^[34]。此外,在海洋环境中以 *Ca. Scalindua* 为主的样品经过生物反应器的培养后,会演化变成以 *Ca. Brocadia* 和 *Ca. Kuenenia* 为主。这都进一步说明了反应器和污水厂的特殊环境适于 *Ca. Brocadia* 和 *Ca. Kuenenia* 的生存。

河口和湿地环境当中普遍存在 *Ca. Brocadia*、*Ca. Scalindua* 和 *Ca. Kuenenia*, 是多样性最高的 2 个自然生态系统,其中河口中的 *Ca. Scalindua* 和海洋中的 *Ca. Scalindua* 在进化树上的处于不同的分支,表明河口有其特殊的 Anammoxers 的演化

机制。这可能是因为河口和湿地作为复杂的生态系统,收到海洋潮汐、径流输入和人类活动的综合作用,这些因素都可能会影响 Anammoxers 的群落结构和多样性分布。

3 结论

本研究基于 NCBI 数据库中 Anammoxers 的 16SrRNA 基因序列,利用 Mothur 程序进行了不同类型生境中 Anammoxers 多样性分析。研究表明,海洋环境中 *Ca. Scalindua* 属占有绝对主导优势,淡水环境中存在 *Ca. Scalindua*、*Ca. Kuenenia* 和 *Ca. Brocadia*, 其中 *Ca. Brocadia* 占据优势地位。反应器和污水厂这 2 个工程系统中主要存在 *Ca. Brocadia*、*Ca. Kuenenia* 和少部分的 *Ca. Jettenia*。农业土壤中主要存在 *Ca. Brocadia*、*Ca. Kuenenia* 和少部分 *Ca. Anammoxoglobus* 与 *Ca. Jettenia*, 不存在 *Ca. Scalindua*。其中农业土壤中占优势的 *Ca. Brocadia* 在进化树上的位置与其它自然生态环境的有显著不同,但是与工程系统中的类型相似,推测农业土壤环境与工程系统具有的高氨氮浓度是影响 *Ca. Brocadia* 多样性分布的重要因素。河口和湿地 Anammox 细菌的多样性最高,普遍存在 *Ca. Scalindua*、*Ca. Brocadia* 和 *Ca. Kuenenia*, 与河口湿地的陆海相互作用的环境特征相一致。总之,Anammoxers 在不同生境中有不同的群落结构和生态分布,是适应不同的生境中的特殊化境长期演化的结果。

参考文献

- [1] Canfield DE, Glazer AN, Falkowski PG. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science*, 2010, 330(6001): 192-196.
- [2] Broda E. Two kinds of lithotrophs missing in nature.

- Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 1977, 17(6): 491–493.
- [3] Mulder A, van de Graaf AA, Robertson L A, Kuenen JG. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 16(3): 177–184.
- [4] Lotti T, Kleerebezem R, Lubello C, van Loosdrecht MCM. Physiological and kinetic characterization of a suspended cell anammox culture. *Water Research*, 2014, 60: 1–14.
- [5] Strous M, Pelletier E, Mangenot S, Rattei T, Lehner A, Taylor MW, Horn M, Daims H, Bartol-Mavel D, Wincker P, Barbe V, Fonknechten N, Vallenet D, Segurens B, Schenowitz-Truong C, Medigue C, Collingro A, Snel B, Dutilh BE, Op den Camp HJ, van der Drift C, Cirpus I, van de Pas-Schoonen KT, Harhangi HR, van Niftrik L, Schmid M, Keltjens J, van de Vossenberg J, Kartal B, Meier H, Frishman D, Huynen MA, Mewes HW, Weissenbach J, Jetten MS, Wagner M, Le Paslier D. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, 2006, 440(7085): 790–794.
- [6] Mao NJ, Ren HQ, Geng JJ, Ding LL, Xu K. Engineering application of anaerobic ammonium oxidation process in wastewater treatment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 33(8): 153.
- [7] Schmid MC, Maas B, Dapena A, van de Pas-Schoonen K, van de Vossenberg J, Kartal B, van Niftrik L, Schmidt I, Cirpus I, Kuenen JG, Wagner M, Damsté JSS, Kuypers M, Revsbech NP, Mendez R, Jetten MSM, Strous M. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 1677–1684.
- [8] Thamdrup B, Dalsgaard T. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1312–1318.
- [9] Song B, Buckner CT, Hembury DJ, Mills RA, Palmer MR. Impact of volcanic ash on anammox communities in deep sea sediments. *Environmental Microbiology Reports*, 2014, 6(2): 159–166.
- [10] Zhu GB, Wang SY, Wang WD, Wang Y, Zhou LL, Jiang B, Op den Camp HJM, Risgaard-Petersen N, Schwark L, Peng YZ, Hefting MM, Jetten MSM, Yin CQ. Hotspots of anaerobic ammonium oxidation at land–freshwater interfaces. *Nature Geoscience*, 2013, 6(2): 103–107.
- [11] Humbert S, Tarnawski S, Fromin N, Mallet MP, Aragno M, Zopfi J. Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity. *The ISME Journal*, 2010, 4(3): 450–454.
- [12] Russ L, Kartal B, op den Camp HJM, Sollai M, Le Bruchec J, Caprais JC, Godfroy A, Damsté JSS, Jetten MSM. Presence and diversity of anammox bacteria in cold hydrocarbon-rich seeps and hydrothermal vent sediments of the Guaymas Basin. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4(1): 219.
- [13] Borin S, Mapelli F, Rolli E, Song B, Tobias C, Schmid MC, De Lange GJ, Reichart GJ, Schouten S, Jetten M, Daffonchio D. Anammox bacterial populations in deep marine hypersaline gradient systems. *Extremophiles*, 2013, 17(2): 289–299.
- [14] Rysgaard S, Glud RN. Anaerobic N₂ production in Arctic sea ice. *Limnology and Oceanography*, 2004, 49(1): 86–94.
- [15] Penton CR, Devol AH, Tiedje JM. Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(10): 6829–6832.
- [16] Shartau SLC, Yurkiw M, Lin SP, Grigoryan AA, Lambo A, Park HS, Lomans BP, van der Biezen E, Jetten MSM, Voordouw G. Ammonium concentrations in produced waters from a mesothermic oil field subjected to nitrate injection decrease through formation of denitrifying biomass and anammox activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(15): 4977–4987.
- [17] Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, Logemann S, Muyzer G, van de Pas-Schoonen KT, Webb R, Kuenen JG, Jetten MSM. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 1999, 400(6743): 446–449.
- [18] Hu BL, Shen LD, Liu S, Cai C, Chen TT, Kartal B, Harhangi HR, Op den Camp HJM, Lou LP, Xu XY, Zheng P, Jetten MSM. Enrichment of an anammox bacterial community from a flooded paddy soil. *Environmental Microbiology Reports*, 2013, 5(3): 483–489.
- [19] Hong YG, Li M, Cao HL, Gu JD. Residence of habitat-specific anammox bacteria in the deep-sea subsurface sediments of the South China Sea: analyses of marker gene abundance with physical chemical parameters. *Microbial Ecology*, 2011, 62(1): 36–47.
- [20] Hendrickx TLG, Kampman C, Zeeman G, Temmink H, Hu

- ZY, Kartal B, Buisman CJN. High specific activity for anammox bacteria enriched from activated sludge at 10 °C. *Bioresource Technology*, 2014, 163: 214–221.
- [21] Wang J, Gu JD. Dominance of *Candidatus Scalindua* species in anammox community revealed in soils with different duration of rice paddy cultivation in Northeast China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(4): 1785–1798.
- [22] Ali M, Oshiki M, Awata T, Isobe K, Kimura Z, Yoshikawa H, Hira D, Kindaichi T, Satoh H, Fujii T, Okabe S. Physiological characterization of anaerobic ammonium oxidizing bacterium ‘*Candidatus Jettenia caeni*’. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(6): 2172–2189.
- [23] Kartal B, Koleva M, Arsov R, van der Star W, Jetten MSM, Strous M. Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater. *Journal of Biotechnology*, 2006, 126(4): 546–553.
- [24] Hou LJ, Zheng YL, Liu M, Gong J, Zhang XL, Yin GY, You L. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacterial diversity, abundance, and activity in marsh sediments of the Yangtze Estuary. *Journal of Geophysical Research Biogeosciences*, 2013, 118(3): 1237–1246.
- [25] Koop-Jakobsen K, Giblin AE. Anammox in tidal marsh sediments: the role of salinity, nitrogen loading, and marsh vegetation. *Estuaries and Coasts*, 2009, 32(2): 238–245.
- [26] Shao SD, Luan XW, Dang HY, Zhou HX, Zhao YK, Liu HT, Zhang YB, Dai LQ, Ye Y, Klotz MG. Deep-sea methane seep sediments in the Okhotsk Sea sustain diverse and abundant anammox bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 87(2): 503–516.
- [27] van de Vossenberg J, Woebken D, Maalcke WJ, Wessels HJCT, Dutilh BE, Kartal B, Janssen-Megens EM, Roeselers G, Yan J, Speth D, Gloerich J, Geerts W, van der Biezen E, Pluk W, Francoijs KJ, Russ L, Lam P, Malfatti SA, Tringe SG, Haaijer SCM, Op den Camp HJM, Stunnenberg HG, Amann R, Kuypers MMM, Jetten MSM. The metagenome of the marine anammox bacterium ‘*Candidatus Scalindua profunda*’ illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(5): 1275–1289.
- [28] Sun W, Xu MY, Wu WM, Guo J, Xia CY, Sun GP, Wang AJ. Molecular diversity and distribution of anammox community in sediments of the Dongjiang River, a drinking water source of Hong Kong. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 116(2): 464–476.
- [29] Sonthiphand P, Neufeld JD. Evaluating primers for profiling anaerobic ammonia oxidizing bacteria within freshwater environments. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57242.
- [30] Moore TA, Xing YP, Lazenby B, Lynch MDJ, Schiff S, Robertson WD, Timlin R, Lanza S, Ryan MC, Aravena R, Fortin D, Clark ID, Neufeld JD. Prevalence of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in contaminated groundwater. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(17): 7217–7225.
- [31] Sher Y, Baram S, Dahan O, Ronen Z, Nejidat A. Ammonia transformations and abundance of ammonia oxidizers in a clay soil underlying a manure pond. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 81(1): 145–155.
- [32] Zhu GB, Wang SY, Wang Y, Wang CX, Risgaard-Petersen N, Jetten MSM, Yin CQ. Anaerobic ammonia oxidation in a fertilized paddy soil. *The ISME Journal*, 2011, 5(12): 1905–1912.
- [33] Oshiki M, Shimokawa M, Fujii N, Satoh H, Okabe S. Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium ‘*Candidatus Brocadia sinica*’. *Microbiology*, 2011, 157: 1706–1713.
- [34] van der Star WRL, Miclea AI, van Dongen UGJM, Muyzer G, Picioreanu C, van Loosdrecht MCM. The membrane bioreactor: a novel tool to grow anammox bacteria as free cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 101(2): 286–294.

Community structure and distribution of anammox bacteria in different habitat

Yiguo Hong^{1,2*}, Tianzheng Huang¹, Yiben Li¹, Jiapeng Wu¹, Lijing Jiao¹, Mingchao Cui²

¹Institute of Environmental Research at Greater Bay, Guangzhou University, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

²School of Environmental Science and Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] Anaerobic ammonium oxidation is a biogeochemical process of oxidizing ammonium and reducing nitrite or nitrate to produce N₂ by anaerobic ammonium-oxidizing bacteria under anaerobic conditions, which is an important process for removing fixed nitrogen from global ecosystem. The objective of this study is to demonstrate the biogeography patterns of ammonium-oxidizing bacteria in diverse habitats. [Methods] Based on the 16S rRNA gene sequences of ammonium-oxidizing bacteria from national center for biotechnology information database, we analyzed the distribution and diversity of ammonium-oxidizing bacteria in different habitat by Mothur Software. [Results] Results showed that *Ca. Scalindua* dominated in marine environment. *Ca. Brocadia* had broad distribution in both freshwater and agricultural soils ecosystem, and it was also dominant in engineered reactors, showing the higher concentration inorganic nitrogen may facilitate *Ca. Brocadia* existence. Wetland and estuary ecosystem had the highest diversity of ammonium-oxidizing bacteria in which *Ca. Scalindua*, *Ca. Brocadia* and *Ca. Kuenenia* all had relative higher abundance. [Conclusion] This study demonstrated the community structure and distribution characteristics of ammonium-oxidizing bacteria in different habitat, suggesting that different environmental factors in different habitat affect the population distribution and phylogenetic evolution of ammonium-oxidizing bacteria.

Keywords: anaerobic ammonium-oxidizing bacteria, gene database, diversity, habitat, community structure

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31870100, 41576123, 9185111) and by the Research Foundation for Talented Scholars of Guangzhou University (GZHU-B-05)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-39158007; E-mail: yghong@gzhu.edu.cn

Received: 14 September 2018; Revised: 13 November 2018; Published online: 18 February 2019

洪义国, 广州大学大湾区环境研究院“百人计划”特聘教授, 博士生导师, 研究方向为海洋环境微生物分子生态与地球化学。主持承担国家自然科学基金项目、国家重点基础研究发展计划项目课题, 中国科学院战略性先导科技专项子课题, 中国科学院人才专项, 广东省自然科学基金重点项目以及广州市科学研究重点项目等多项课题。发表学术论文60余篇, 其中SCI索引学术论文40余篇, H指数23。曾获得广州市科技进步一等奖(第四), 中国科学院卢嘉锡青年人才奖, 中国科学院优秀博士论文奖, 中国科学院院长奖, 中国水产科学研究院科技进步一等奖(第四完成人), 青岛市技术发明奖二等奖(第五完成人)。中国科学院青年创新促进会会员, *IBB* 和 *Regional Studies in Marine Science* 编委, 污染生态专业委员会委员。

