

从宏基因组推测扎龙湿地未培养甲烷古菌 Rice Cluster II 的代谢途径与可能的盐碱适应性

李慧菊^{1,2}, 李凌燕^{3,4}, 梁红^{1,2}, 高大文^{*1,2}, 东秀珠^{*3,4}

1 北京建筑大学城市环境修复技术研究中心, 北京 100044

2 北京建筑大学 北京节能减排与城乡可持续发展省部共建国家协同创新中心, 北京 100044

3 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

4 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

李慧菊, 李凌燕, 梁红, 高大文, 东秀珠. 从宏基因组推测扎龙湿地未培养甲烷古菌 Rice Cluster II 的代谢途径与可能的盐碱适应性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4343-4356.

LI Huiju, LI Lingyan, LIANG Hong, GAO Dawen, DONG Xiuzhu. Metagenomic analysis of metabolic pathways and possible saline-alkaline adaptation of uncultured methanogens of Rice Cluster II in Zhalong wetland[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4343-4356.

摘要:【背景】湿地是重要的甲烷排放源, 因为其中栖息着各种产甲烷古菌。已知未培养甲烷古菌 Rice Cluster II (RCII)类群广泛分布于低温酸性和北方泥炭藓湿地、淡水湿地及草本沼泽等环境, 但它们在低温盐碱湿地中的分布及代谢途径尚未知。【目的】分析扎龙盐碱湿地未培养甲烷古菌 RCII 类群的多样性、推测产甲烷代谢途径及其潜在的盐碱适应机制。【方法】16S rRNA 基因扩增子测序分析扎龙湿地土壤中甲烷古菌群组成; 构建 16S rRNA 基因克隆文库分析扎龙湿地土壤 RCII 的多样性; 宏基因组分析推测 RCII 古菌编码的产甲烷途径及与耐盐碱相关物质的合成基因。【结果】16S rRNA 基因高通量测序发现未培养甲烷古菌的 RCII 类群占扎龙盐碱湿地总甲烷古菌的 13.280%±0.019%; 系统发育学分析表明该湿地的 RCII 由 3 个分支组成; 宏基因组分析组装了 2 个优势的未培养 RCII 的基因组, 均含完整的氢还原二氧化碳产甲烷途径的基因, 并编码海藻糖的转运与合成基因。【结论】扎龙盐碱湿地土壤富含未培养 RCII 甲烷古菌, 推测它们通过氢还原二氧化碳产甲烷, 利用细胞内高的海藻糖适应盐碱环境。

关键词: 盐碱湿地; 甲烷古菌; Rice Cluster II; 宏基因组; 海藻糖

资助项目: 国家自然科学基金(92251302, 32070061, 31971468)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (92251302, 32070061, 31971468).

*Corresponding authors. E-mail: GAO Dawen, gaodawen@bucea.edu.cn; DONG Xiuzhu, dongxz@im.ac.cn

Received: 2023-03-25; Accepted: 2023-05-12; Published online: 2023-07-11

Metagenomic analysis of metabolic pathways and possible saline-alkaline adaptation of uncultured methanogens of Rice Cluster II in Zhalong wetland

LI Huiju^{1,2}, LI Lingyan^{3,4}, LIANG Hong^{1,2}, GAO Dawen^{*1,2}, DONG Xiuzhu^{*3,4}

1 Centre for Urban Environmental Remediation, Beijing University of Civil Engineering and Architecture, Beijing 100044, China

2 Beijing Energy Conservation & Sustainable Urban and Rural Development Provincial and Ministry Co-construction Collaboration Innovation Center, Beijing University of Civil Engineering and Architecture, Beijing 100044, China

3 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Background] Wetlands harboring a variety of methane-producing archaea emit ample methane. The uncultured methanogens, Rice Cluster II (RCII), exist widely in cold acidic peatlands, freshwater lake wetlands, minerotrophic fens, and northern peat moss. However, the distribution and metabolic pathways of RCII in the low-temperature saline-alkaline wetlands remain unknown. [Objective] To investigate the diversity and infer the methanogenic pathways and potential adaptation mechanisms of RCII in saline-alkaline Zhalong wetland. [Methods] High-throughput sequencing of the 16S rRNA genes in the top layer of soil was performed to reveal the composition of methanogenic archaea. We established the 16S rRNA gene clone library to analyze the phylogenetic clusters of RCII. We then conducted metagenomic analysis to infer the methanogenic pathways and the possible saline-alkaline adaptation mechanisms of the RCII in Zhalong wetland. [Results] The uncultured RCII methanogens accounted for 13.280%±0.019% of the total methanogenic archaea in Zhalong wetland and were clustered into three phylogenetic groups. Two metagenome-assembled genomes of RCII possessed the complete suite of genes involved in methanogenesis via reduction of carbon dioxide. Furthermore, the two RCII genomes contained the genes associated with the transport and synthesis of trehalose. [Conclusion] Abundant uncultured RCII methanogens inhabit the saline-alkaline Zhalong wetland, and they can produce methane by reducing carbon dioxide and use the compatible solute trehalose to adapt to the saline-alkaline environment.

Keywords: saline-alkaline wetland; methanogenic archaea; Rice Cluster II; metagenome; trehalose

天然湿地每年排放的甲烷(CH₄)高达100–231 Tg, 占全球甲烷年排放量的20%–39%^[1]。内陆盐碱湿地是湿地的重要组成部分, 具有内陆性和盐碱化的独特属性, 分布于干旱-半干旱和半干旱-亚湿润过渡气候区内, 位于欧亚大陆中高纬度地区^[2]。位于我国黑龙江省的松嫩平

原是世界三大苏打盐碱土分布区之一, 也是我国内陆盐碱湿地集中分布的区域^[3]。Liu等^[4]和Zhang等^[5]发现扎龙盐碱湿地是甲烷排放热点。

甲烷古菌是已知唯一能产生大量甲烷的生物, 它们位于厌氧消化“食物链”的末端, 将其他微生物分解有机物产生的H₂/CO₂、乙酸、甲

基化合物等简单化合物转化为甲烷^[6-7]。目前已知甲烷古菌通过 6 条不同的产甲烷途径产甲烷: (1) 氢营养型产甲烷途径(以 H₂ 或甲酸盐还原 CO₂/碳酸氢盐产甲烷)^[8]; (2) 甲基营养型产甲烷途径(还原甲基化合物产甲烷)^[9-10]; (3) 乙酸裂解产甲烷途径(将乙酸裂解产甲烷和二氧化碳)^[11]; (4) 氢还原甲基营养型产甲烷途径(以氢还原甲基物质)^[12]; (5) 甲氧基营养型代谢产甲烷途径^[13]; (6) 烷基营养型代谢产甲烷途径^[14]。Liu 等^[15]对青藏高原数个低温盐湖沉积物的分子生态学调查发现, 甲烷丝菌(*Methanotherix*)和甲烷叶菌(*Methanobolus*)是优势的甲烷古菌群; 未培养的深古菌门(*Candidatus Bathyarchaeota*)序列含量高, 提示深古菌这类非传统的甲烷古菌可能对青藏高原低温湖泊湿地的甲烷排放也有贡献。任秘坊等^[16]从青藏高原的 4 个湖沉积物和湖滨湿地中分离到与嗜冷甲烷叶菌 R15 高度同源的菌株, 表明行使甲醇产甲烷途径的嗜冷甲烷叶菌广泛分布于低温湿地。甲烷盐碱古菌(*Methanonatronarchaeia*)是与嗜盐古菌亲缘关系密切的甲烷古菌, 属于超高盐度生境中的未培养 SA1 家族, 目前仅获得 2 个 *Methanonatronarchaeia* 的菌株, 分别是分离于碱湖的 *Methanonatronarchaeum thermophilum* AMET 和盐湖的 *Candidatus Methanohalarchaeum thermophilum* HMET^[17]。目前只在盐碱湖中发现 *Methanonatronarchaeia* 的存在^[17]。Sorokin 等^[18]对西伯利亚西南部地区盐碱湖甲烷古菌群调查发现, 乙酸型的甲烷丝菌(*Methanotherix*)在低于 3 mol/L 盐浓度的湖中占优势; 而在盐浓度高于 3 mol/L 的湖中甲基类甲烷古菌占优势, 主要是甲烷叶菌属(*Methanobolus*)。截至目前, 从高盐生境中分离的耐盐甲基营养型甲烷古菌有 3 种, 包括甲烷盐菌属(*Methanohalobium*)、甲烷嗜盐菌属(*Methanohalophilus*)和甲烷咸菌属

(*Methanosalsum*)^[17]。以上研究表明, 盐浓度是影响甲烷古菌分布的重要环境因子。

目前报道的未培养甲烷古菌 Rice Cluster II (RCII) 主要分布于酸性泥炭藓湿地^[19-20]、淡水湖湿地^[21]、草本沼泽^[22]、北方泥炭藓沼泽^[23]和海底永冻土沉积物^[24]。Mondav 等^[25]通过宏基因组学分析, 从瑞典北部冻土融化层中获得首个 *Candidatus Methanoflorens stordalenmirensis* 的基因组, 属于甲烷袋菌目(*Methanocellales*)和 Rice Cluster II (RCII)。在其基因组中发现有编码完整氢还原 CO₂ 产甲烷途径的基因; 并发现该菌广泛分布于北极冻土及湿地^[25], 暗示 Rice Cluster II 的甲烷古菌属于低温微生物。

本研究通过高通量测序及系统发育学分析方法分析扎龙盐碱湖湿地中的 RCII 类群甲烷古菌的生物多样性, 从宏基因组分析推测扎龙盐碱湖湿地中未培养甲烷古菌 RCII 的代谢途径及其可能的盐碱适应机制, 以期为深入研究这类耐低温耐盐碱的甲烷古菌及其对甲烷排放的贡献提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

研究所用样品采集于我国东北扎龙盐碱湿地自然保护区土壤, 采样点地理位置为 46°52′-47°32′N、123°47′-124°37′E, 该区的年平均气温 3.5 °C。采样时间为 2021 年 6 月 9 日, 采样时空气和土壤平均温度分别为 25.3 °C 和 17.5 °C; 采样地的平均水位为 19.3 cm, 土壤 pH 8.2-8.6, 盐浓度范围约为(61.8±0.07)-(101.1±0.12) mg/L^[26], 湿地水中的平均钠离子浓度约为 35-101.94 mg/L^[27-28]。使用内径 38 mm 的土钻采集深度 0-20 cm 的样方土壤, 将 5 个重复样品去除表面的芦苇根叶后等量混合, 装入无菌自封袋中, 4 °C 保存运回实验室, 保藏于-80 °C 备用。

Fast DNA SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 美基生物科技有限公司; *Ex Taq* PCR 体系、pMD19-T Vector, TaKaRa 公司; PCR 及 RT-qPCR 所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。NanoDrop ND-1000 超微量分光光度计, Thermo Fisher 公司。

1.2 DNA 提取和高通量测序

称取 0.5 g 土壤样品, 按照 Fast DNA SPIN Kit for Soil 说明书提取土壤样品基因组 DNA。用 NanoDrop ND-1000 和 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 保存于 -20°C 待用。通过高通量测序检测湿地土壤古菌 16S rRNA 基因多样性。委托上海凌恩生物科技有限公司利用引物 Arch519F (5'-CAGCCGCCGCGGTAA-3')和 Arch915R (5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCT-3')^[29] 扩增古菌 16S rRNA 基因的 V4 和 V5 区侧翼的 399 bp 片段。PCR 反应体系(20 μL): 5 \times FastPfu buffer 4 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL , 上、下游引物(5 $\mu\text{mol/L}$)各 0.8 μL , FastPfu polymerase (2.5 U/ μL) 0.4 μL , 模板 DNA (10 ng/ μL) 1 μL , ddH₂O 补足 20 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

在 Illumina 平台进行 PE250 模式建库完成测序及聚类注释。测序得到的原始数据经高质量质控及使用 UCHIME 软件鉴定并移除嵌合序列后获得有效数据, 采用 UPARSE v7.1 (<http://drive5.com/uparse/>)软件将相似性达 97% 的序列聚类为分类操作单元(operational taxonomic units, OTU)。采用 RDP classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>)贝叶斯算法对 OTU 代表序列进行分类学分析, 比对 Silva 数据库(视实际研究对象变更), 置信度阈值为 0.7, 最终获得每个 OTU 在各个分类学水平上的物种信息。

1.3 16S rRNA 基因克隆文库构建

采用修改的甲烷古菌特异的 16S rRNA 基因引物 Met86F/Met1340R (5'-GCTCAGTAAC ACGTGG-3'/5'-CGGTGTGTGCAAGGAG-3') 进行 PCR 扩增和克隆文库构建^[30-31], 扩增的 16S rRNA 基因片段大小为 1 254 bp。PCR 反应体系 (25 μL): 10 \times *Ex Taq* buffer 2.5 μL , dNTP Mixture (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , *Ex Taq* (5 U/ μL) 0.25 μL , Primer F (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Primer R (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 模板(20 ng/ μL) 1 μL , ddH₂O 补足 25 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min^[30-31]。PCR 扩增后使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒按照说明书回收目标条带, 并将回收的 DNA 片段克隆到 pMD19-T 载体后, 转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。阳性克隆子送擎科生物科技有限公司(北京)进行测序。

1.4 系统发育树构建

利用 Silva 数据库(<https://www.arb-silva.de/aligner/>)对克隆子的 16S rRNA 基因进行测序, 将测定的序列进行相似性比对后, 将 45 个序列鉴定为未培养甲烷古菌 RCII。以 20 条从其他生境中获得的 RCII 16S rRNA 基因序列为参考, 通过 ClustalW 比对序列相似性, 然后使用 MEGA 11.0 软件^[32]中的邻接法构建系统发育树, 基于最大似然法(1 000 bootstrap)的引导程序评估系统树各分支聚类的稳定性, 每个分支节点的数量显示引导程序支持的百分比。

鉴定的扎龙盐碱湿地中 RCII 的 16S rRNA 基因序列储存于 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 序列号为 OQ560364-OQ560380。

1.5 宏基因组测序和分析

宏基因组测序在上海凌恩生物科技有限公司进行, 构建宏基因组霰弹枪测序文库并对其进行测序。将 1.00-1.21 μg 样品基因组 DNA 打

碎, 并用长度约为 450 bp 的片段制备测序文库, 采用双端 150 bp (PE150)模式进行测序。对原始测序数据的质控使用 Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) 进行, 除去衔接子污染物和低质量读数^[33]。然后通过 BWA mem 算法(参数: -M -k 32 -t 16, <http://bio-bwa.sourceforge.net/bwa.shtml>)去除宿主基因组污染和低质量数据的 reads 得到原始数据 clean data, 用于进一步分析。

原始数据进一步使用 metaWRAP^[34]中的 read_qc 模块进行过滤和质控。使用 MEGAHIT v1.1.3^[35] (默认参数)进行组装并去除长度小于 1 000 bp 短 contigs。在 MetaWRAP 的分箱模块中同时使用 3 种分箱方法(CONCOCT v1.0.0^[36]、MetaBAT2 v2.12.1^[37]和 MaxBin2 v2.2.6^[38])用于获取初始元基因组组装基因组 (metagenome assembled genome, MAGs)。然后使用 metaWRAP 中的 bin_refinement 模块将 3 个 MAGs 集合整合优化, 得到最终的 MAGs 集合。使用 GTDB Tk v1.0.2^[39] (classywf 工作流, 默认参数)对 MAGs 进行物种分类注释, 使用 Prokka v1.13^[40]和

KofamKOALA^[41]进行蛋白功能注释。

2 结果与分析

2.1 扎龙湿地表层土含有丰富的未培养甲烷古菌 RCII

将采集的 12 个样点的扎龙湿地表层土壤均匀混合为一个样品, 提取基因组 DNA, 在 Illumina 平台上测定 16S rRNA 基因的 V4 和 V5 区, 并通过序列同源性进行 OTU 聚类分析。结果 3 408 个 OTU 被鉴定为古菌, 其中已知分类地位的古菌占鉴定的总古菌 OTU 的 61.17%, 鉴定为甲烷古菌的 OTU 有 35 个, 45 个属于未培养甲烷古菌 Rice Cluster II (RCII)。图 1 展示了扎龙湿地土壤中不同产甲烷菌科物种的组成, 其中氢营养型的甲烷杆菌科 (*Methanobacteriaceae*, 45.85%) 丰度最高, 其次是厌氧氧化甲烷的噬甲基甲烷古菌科 (*Methanoperedenaceae*, 17.23%) 以及未培养的 RCII (13.28%), 而乙酸裂解型甲烷古菌-甲烷丝菌科 (*Methanotrichaceae*, 9.96%) 和甲烷八叠球菌科 (*Methanosarcinaceae*, 5.66%) 的含量较低。物种组成分析说明扎龙盐碱湿地中存在丰富的未培养甲烷古菌 RCII 类群。

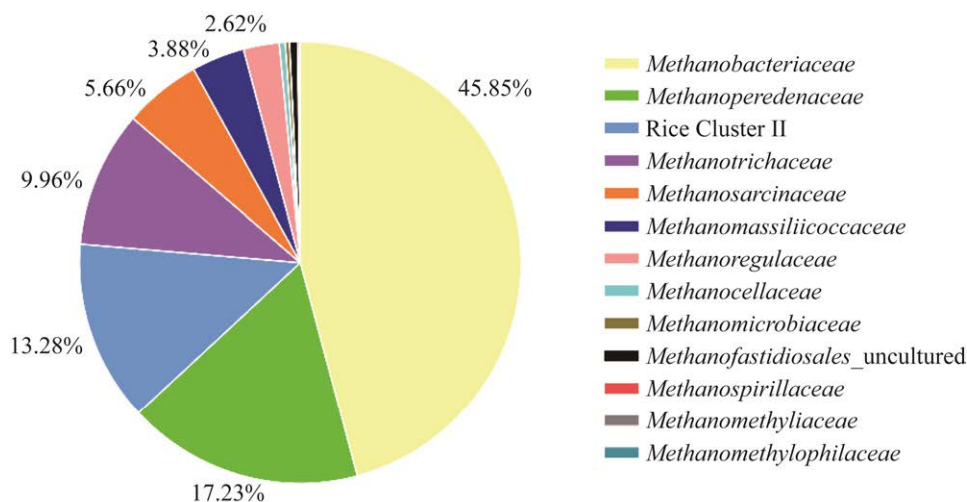


图 1 扎龙湿地表层土壤中产甲烷古菌的相对丰度饼图

Figure 1 Relative abundances of methanogenic archaea in the surface soil of Zhalong wetland.

2.2 16S rRNA 基因系统发育分析表明扎龙盐碱湿地中存在 RCII 的新类群

为了分析 RCII 甲烷古菌的系统发育分支的多样性, 采用甲烷古菌 16S rRNA 基因的通用引物对 Met86F/Met1340R 扩增古菌 16S rRNA 基因的近全长序列(1 254 bp), 并获得了 165 个克隆子(表 1)。序列同源性分析将 30.30%克隆子鉴定为甲烷丝菌科(*Methanotrichaceae*); 27.27%的克隆子鉴定为 RCII 类群; 10.30%的克隆子鉴定为 *Methanoregulaceae*; 10.30%的克隆子鉴定为厌氧氧化甲烷的噬甲基甲烷古菌科(*Methanoperedenaceae*); 7.88%的克隆子鉴定为甲烷八叠球菌科(*Methanosarcinaceae*); 7.88%的克隆子鉴定为深古菌门(*Bathyarchaeia*); 6.06%的克隆子鉴定为甲烷杆菌科(*Methanobacteriaceae*)。

将获得的 RCII 的 16S rRNA 基因序列与其他生境中未培养的 RCII 进行同源性分析, 并以与 RCII 近缘的甲烷袋菌属(*Methanocellus*, Rice Cluster I)、甲烷马赛球菌属(*Methanomassiliicoccus*, Rice Cluster III)以及与 RCII 远缘的甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)作为外群, 构建系统发育树(图 2)。结果表明, RCII 与甲烷胞菌(*Methanocellus*, Rice Cluster I)相似性仅为 87.40%, 与甲烷马赛球菌属(*Methanomassiliicoccus*, Rice Cluster III)的相似性约为 82.17%, 与甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)的相似性约为 55.65%。然而

扎龙盐碱湿地的 RCII 在 16S rRNA 基因序列相似性低于 2.2%时分为 3 个分支, 分支 1 的 3 个克隆子与海底永冻土的 RCII (FJ99954.1)相似性较高(96.79%); 分支 2 包含 7 个亚类群(共 29 个克隆子), 其中 OQ560364 和 OQ560373 与来自太湖沉积物以及酸性泥炭地生境中未培养的 RCII 聚在一起, 相似性 98.61%, 分支 2 与分支 1 相似性为 95.87%; 与 RCII 分支 1 和分支 2 的相似性分别为 93.5%和 97.8%, 分支 3 单独聚为一支, 其与最近缘的 RCII (如酸性泥炭地的 JN649254.1)的 16S rRNA 基因相似性仅为 96.52%, 可能代表了一个新类群。

上述结果表明, 扎龙盐碱湿地存在与其他生境如海底永冻土以及酸性泥炭地不同的 RCII 新类群。

2.3 宏基因组组装的 RCII 基因组表明它们是氢营养型甲烷古菌

基于 Illumina 平台的宏基因组测序和组装获得了完整度大于 50%、污染率低于 10%的 39 个 MAGs, 其中 31 个 MAGs 属于细菌、8 个 MAGs 属于古菌(表 2), 2 个被鉴定为 RCII。宏基因组学分析组装的 2 个 RCII 菌株的基因组信息见表 3。

菌株 ZL_bin.22 和 ZL_bin.25 的基因组与 Mondav 等^[25]在瑞典北部永久冻土解冻层发现的唯一一株基因组接近完整的 *Candidatus*

表 1 16S rRNA 基因克隆子鉴定的扎龙湿地的甲烷古菌组成

Table 1 16S rRNA gene clones identified methanogen compositions in Zhalong wetland

OTU	Clone numbers	Most related archaea	16S rRNA gene similarity (%)
OTU1	50	Uncultured <i>Methanotrix</i> sp. clone Pav-sed-103	97.15–99.75
OTU2	45	Rice Cluster II	94.74–99.42
OTU3	17	<i>Methanoregula</i> sp. UBA154	94.84–99.41
OTU4	17	<i>Candidatus</i> <i>Methanoperedens</i>	94.48–99.50
OTU5	13	Uncultured <i>Methanosarcina</i> sp. KWLA25	99.00–99.58
OTU6	13	<i>Bathyarchaeia</i>	97.25–99.50
OTU7	10	<i>Methanobacterium petrolearium</i> strain Mic5c12	92.92–99.66

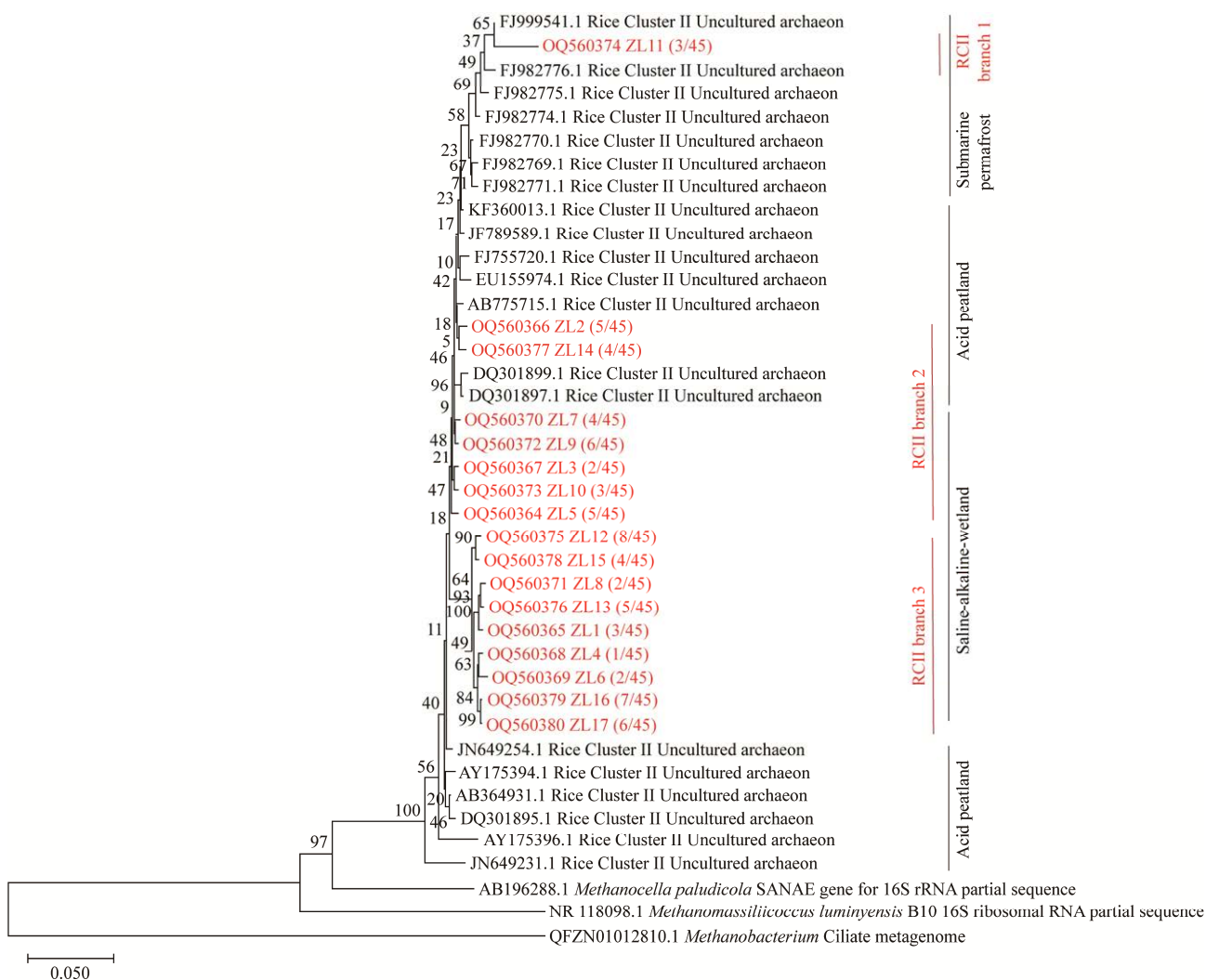


图 2 扎龙盐碱湿地表层土壤的未培养甲烷古菌 RCII 类群的系统发育树 以甲烷袋菌(RCI)-16S rRNA 基因序列和甲烷马赛球菌(RCIII)-16S rRNA 基因序列以及甲烷杆菌作为外群, 使用 MEGA 11 软件的邻接法构建系统发育树. 基于 1 000 次重复抽样的 bootstrap 检验评估分支聚类的稳定性, 每个分支节点的数字是分支聚类的百分数. 红色字母表示扎龙湿地的 RCII 序列, 黑色字母表示其他生境的 RCII 及外群序列. 前缀表示 16S rRNA 基因在 NCBI 数据库的登录号, 括号中是 RCII 的克隆子数/总克隆数, 距离标尺长度代表 5% 的序列差异

Figure 2 The 16S rRNA gene phylogenetic tree of the RCII methanogens retrieved from the surface soil of Zhalong saline-alkaline wetland. The tree was constructed using neighbour-joining algorithms with MEGA 11 and used *Methanocella* (RCI), *Methanomassiliicoccus luminyensis* (RCIII) and *Methanobacterium* 16S rRNA gene sequences as outgroups. The tree topology was estimated by bootstraps based on 1 000 replications, and number at each branch node shows the percentage supported by bootstraps. Red letters specified the Rice Cluster II obtained in this study, and black letters indicated the reference sequences. Prefixes represent 16S rRNA gene accession numbers and in parenthesis are clone numbers over the total; Bar: 5% sequence divergence.

表 2 从扎龙湿地土壤中获得的古菌 MAGs

Table 2 Composition of archaea in Zhalong wetland soil with metagenomic analysis

Bin No.	Completeness (%)	Contamination (%)	GTDB taxonomy		Relative abundance in all MAGs (%)	Relative abundance in archaeal MAGs (%)
			Class	Family		
ZL_bin.25	89.21	5.305	p_ <i>Halobacteriota</i> ;	f_ <i>RCII</i>	2.19	38.68
ZL_bin.22	57.87	1.960	c_ <i>RCII</i>		3.03	
ZL_bin.3	62.13	1.633	c_ <i>Methanosarcinia</i>	f_ <i>Methanoperedenaceae</i>	1.14	22.23
ZL_bin.16	52.95	3.271	c_ <i>Bathyarchaeia</i>	f_ <i>UBA233</i>	1.93	14.08
ZL_bin.36	85.46	2.610	c_ <i>Methanobacteria</i>	f_ <i>Methanobacteriaceae</i>	0.36	12.46
ZL_bin.27	76.00	2.225	c_ <i>Methanomicrobia</i>	f_ <i>Methanosphaerulaceae</i>	0.31	5.83
ZL_bin.48	60.55	8.861	p_ <i>Thermoplasmatota</i> ;	f_ <i>DHVEG-1</i>	0.69	3.11
			c_ <i>E2</i>			
ZL_bin.40	51.69	7.189	c_ <i>Methanosarcinia</i>	f_ <i>Methanotrichaceae</i>	0.17	3.02

Methanoflorens stordalenmirensis 的基因组平均核苷酸一致性 (average nucleotide identities, gANI) 分别为 63% 和 64%，表明扎龙湿地上层土壤的 RCII 是不同于地球北极圈的物种，属于新物种。

与瑞典北部冻土融化层中 *Candidatus Methanoflorens stordalenmirensis*^[25] 的基因组相似，ZL_bin.22 和 ZL_bin.25 含有较完整的氢还

表 3 扎龙盐碱湿地 2 株 RCII 的基因组概览

Table 3 Genome statistics of the two RCII strains retrieved from Zhalong saline-alkaline wetland

Item	ZL_bin.22	ZL_bin.25
Contig numbers	200	113
Total length (bp)	1 166 987	1 601 764
Completeness (%)	59.47	89.21
Contamination (%)	5.905	5.305
GC content (%)	49	51
N50	7 491	23 104
rRNA	0	0
tRNAs	14	31
Number of coding sequences	1 247	1 733
Relative abundance in all MAGs (%)	10.92	18.85
Relative abundance in archaeal MAGs (%)	14.19	24.49

原二氧化碳代谢产甲烷途径的功能基因(表 4), 包括甲酰甲烷呋喃脱氢酶基因(formyl-methanofuran dehydrogenase, *fmd*)、甲酰甲烷呋喃/四氢甲烷喋呤甲酰转移酶基因(formylmethanofuran/H₄MPT formyltransferase, *ptr*)、甲基四氢甲烷喋呤环化水解酶基因(methenyl-H₄MPT cyclohydrolase, *mch*)、F₄₂₀ 依赖的亚甲基四氢甲烷喋呤脱氢酶基因(F₄₂₀-dependent methylene-H₄MPT reductase, *mer*)、Na⁺转运甲基四氢甲烷喋呤-甲基转移酶基因(Na⁺ translocating methyl-Tetrahydromethanopterin S-methyltransferase, *mtr*)、甲基辅酶 M 还原酶编码基因(methyl-coenzyme M reductase, *mcr*)、铁氧还蛋白基因(ferredoxin, *fd*)、异二硫化物还原酶基因(CoB-CoM heterodisulfide reductase, *hdrABC*)、非 F₄₂₀ 还原氢酶基因(F₄₂₀-non-reducing hydrogenase, *mvhAG*)和膜结合氢酶基因(putative membrane-bound hydrogenase, *mbhJ*)。基因组完整度更高的 ZL_bin.25 还具有 F₄₂₀ 依赖的亚甲基四氢甲烷喋呤脱氢酶(F₄₂₀-dependent methylene H₄MPT dehydrogenase, *mtd*)和能量转化氢酶基因(energy-converting hydrogenase, *ehbQ*), 但并未发现其含有代谢乙酸、甲胺类、甲醇等乙酸代谢产

表 4 扎龙盐碱湿地 2 个 RCII MAGs 的甲烷产生途径基因

Table 4 Genes involved in methanogenesis in the two RCII MAGs retrieved from Zhalong saline-alkaline wetland

Abbreviation	ZL_bin.22	ZL_bin.25	Function annotation
<i>fmdC</i>	+	+	甲酰甲烷呋喃脱氢酶 Formyl-methanofuran dehydrogenase
<i>ptr</i>	+	+	甲酰甲烷呋喃/四氢甲烷喋呤甲酰转移酶 Formylmethanofuran/H ₄ MPT formyltransferase
<i>mch</i>	+	+	甲基四氢甲烷喋呤环化水解酶 Methenyl-H ₄ MPT cyclohydrolase
<i>mtd</i>	-	+	F ₄₂₀ 依赖的亚甲基四氢甲烷喋呤脱氢酶 F ₄₂₀ -dependent methylene H ₄ MPT dehydrogenase
<i>mer</i>	+	+	F ₄₂₀ 依赖的亚甲基四氢甲烷喋呤还原酶 F ₄₂₀ -dependent methylene-H ₄ MPT reductase
<i>mtrH</i>	+	+	Na ⁺ 转运甲基四氢甲烷喋呤-甲基转移酶 Na ⁺ translocating methyl-Tetrahydromethanopterin S-methyltransferase
<i>mcr</i>	+	+	甲基辅酶 M 还原酶 Methyl-coenzyme M reductase
<i>fd</i>	+	+	铁氧还蛋白 Ferredoxin
<i>hdrABC</i>	+	+	异二硫化物还原酶 CoB-CoM heterodisulfide reductase
<i>mvhAG</i>	+	+	F ₄₂₀ 非还原性氢酶 F ₄₂₀ -non-reducing hydrogenase
<i>mbhJ</i>	+	+	膜结合氢酶 Putative membrane-bound hydrogenase
<i>ehbQ</i>	-	+	能量转化氢酶 Energy-converting hydrogenase

+: 基因存在; -: 基因不存在

+: The presence of the gene; -: The absence of the gene.

甲烷途径以及甲基类营养型产甲烷途径相关的功能基因。

尽管 *Ca. Methanoflorens stordalenmirensis* 与 ZL_bin.22 和 ZL_bin.25 均属于甲烷袋菌目^[42], 但与该目中低温的物种不同, 它们既无膜结合的 *hdrDE* (CoB-CoM heterodisulfide reductase), 也无细胞色素, 说明 RCII 甲烷古菌无细胞膜结合的呼吸链, 但是 ZL_bin.25 含有膜结合的能量转化氢酶基因(energy-converting hydrogenase, *ehbQ*)。

综上所述, 扎龙盐碱湿地土壤中 RCII 的 MAGs 丰度最高, 宏基因组组装的 RCII 基因组中含完整的氢还原二氧化碳产甲烷途径的功能基因, 说明其为氢营养型甲烷古菌。

2.4 宏基因组学分析显示扎龙湿地 RCII 可能的耐盐碱机制

研究已知生物适应渗透压的主要机制包括

“盐入”策略和“相容溶质”策略^[43-44]。“盐入”策略基于 K⁺ 的输入平衡高 Na⁺ 浓度^[45], K⁺ 可激活和/或诱导一系列的酶和转运系统, 生物赋予适应改变的渗透压^[46]。而且已知生物, 尤其是极端嗜盐古菌通过从头合成或从环境中摄取有机溶质海藻糖和甘氨酸甜菜碱, 发挥保护细胞耐受渗透压的作用^[47-48]。基因组分析发现, ZL_bin.25 含有 3 个 K⁺ 转运 ATP 酶(potassium-transporting ATPase ATP-binding subunit, *kdpB*)编码基因 JIDDPFIC_00422、JIDDPFIC_00993 和 JIDDPFIC_01677; 1 个钙调控的钾离子通道 (calcium-gated potassium channel, *mthK*)编码基因 JIDDPFIC_00325; 7 个海藻糖/麦芽糖转运蛋白(Trehalose/maltose import ATP-binding protein, *malk*) 编码基因, 包括 JIDDPFIC_00459、JIDDPFIC_00586、JIDDPFIC_00652、JIDDPFIC_01263、JIDDPFIC_01509、JIDDPFIC_01610 和

JIDDPFIC_01626 及 1 个合成海藻糖的基因 (trehalose synthase, *treT*) JIDDPFIC_01355, 但未拼接到甜菜碱相关基因。Ding 等^[44]报道, 在 50–100 g/L NaCl 中的嗜盐古菌 *Halorubrum kocurii* 2020YC7 胞内的海藻糖浓度显著上升。这暗示甲烷古菌 RCII 可能利用海藻糖提高细胞抗高渗能力, 从而提高其在盐碱环境中的生存能力(图 3)。

3 讨论与结论

内陆盐碱湿地水分蒸发量大, 在盐化的同

时还伴随碱化的发生, 能在这种环境中生长的只有耐盐耐碱的甲烷古菌, 因此推测它们是该区域 CH₄ 排放的驱动者。Liu 等^[4]和 Zhang 等^[5]研究发现, 扎龙盐碱湿地是甲烷排放的热点。本研究通过 16S rRNA 基因扩增子测序及宏基因组学分析扎龙盐碱湿地的甲烷古菌组成, 发现未培养甲烷古菌 RCII 丰度较高, 暗示它们对盐碱湿地的甲烷排放有一定贡献。对甲烷古菌 16S rRNA 基因全长序列的同源性分析发现, 扎龙盐碱湿地的 RCII 是不同于其他生境(如海底永冻土和西伯利亚酸性泥炭地)的新类群。宏基

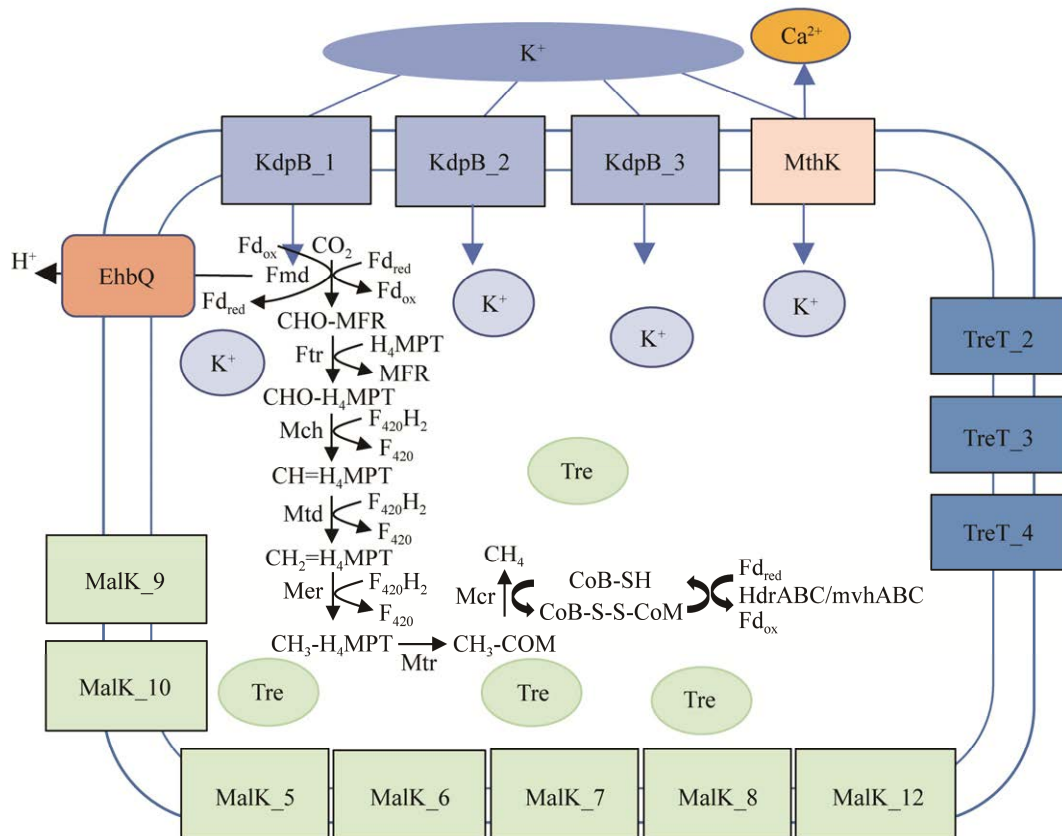


图 3 推测的扎龙湿地未培养甲烷古菌 RCII 的嗜盐机制 H₄MPT: 四氢甲烷喋呤; TreT: 海藻糖合酶; Tre: 海藻糖; MalK: 海藻糖转运 ATP 结合蛋白; KdpB: K⁺转运 ATP 酶; MthK: 钙调控的钾离子通道

Figure 3 Predicted saline adaptive mechanisms of RCII in zhalong wetland. TreT: Trehalose synthase; Tre: Trehalose; MalK: Trehalose import ATP-binding protein; KdpB: ATP-binding subunit; MthK: Calcium-gated potassium channel.

基因组组装的基因组分析推测发现, 扎龙盐碱湿地的 RCII 也通过氢还原二氧化碳产甲烷, 可能利用海藻糖适应盐碱环境。

目前基于 16S rRNA 基因多样性分析得知 RCII 广泛分布于低温及酸性湿地中, 如已报道的 RCII 主要分布于西伯利亚酸性泥炭藓湿地 (pH 4.2–4.8)^[19-20]、淡水湖湿地^[21]、草本沼泽^[22]、北方泥炭藓沼泽^[23]和西伯利亚东北部海底永冻土沉积物^[24]等生境, 但目前尚未获得 RCII 甲烷古菌的纯培养物。对 RCII 生物学特征及代谢途径的分析也只限于对从瑞典北部永久冻土解冻层获得的唯一一个接近完整基因组的 *Candidatus Methanoflorens stordalenmirensis* 的分析, 发现其为氢还原二氧化碳产甲烷途径^[25]。综合 16S rRNA 基因多样性分析、系统发育分析和宏基因组分析, 发现扎龙盐碱湿地中生活着 RCII 的新类群, 宏基因组学分析显示它们属于甲烷袋菌目, 但 ZL_bin.22 和 ZL_bin.25 与低温生境的其他物种不同, 不含细胞色素和膜结合的异二硫化物还原酶 HdrDE, 暗示扎龙湿地的 RCII 无膜结合的电子呼吸链系统, 与已报道的低温生境甲烷袋菌目的大部分菌株含细胞色素 C 不同^[25]。然而, 与菌株 *Candidatus Methanoflorens stordalenmirensis* 不同, ZL_bin.25 含有细胞膜结合的能量转换氢酶编码基因(energy-converting hydrogenase, *ehbQ*)^[42]。这表明扎龙湿地的 RCII 可能既利用胞质氢酶-异硫化物还原酶 MvhAG/HdrAB 复合体, 通过电子歧化机制耦联 CoM-S-S-CoB 的还原产生甲烷, 又可以利用膜结合的 EhbQ 产生 H₂ 和还原态的铁氧化还原蛋白, 后者再启动产甲烷途径的第 1 步反应——还原 CO₂ 产甲酰基甲烷呋喃。扎龙湿地 RCII 编码两类氢酶可能是其在低温、低氢下产甲烷的分子基础。

与细菌耐盐机制不同, 钾离子而非相容溶

质是极端嗜盐古菌主要的高渗保护剂^[42-49]。为适应高盐碱环境, 初期胞内 K⁺ 含量显著上调, 随着时间的推移, 胞内积累的抗高渗物质为脯氨酸及甜菜碱^[50]。但研究也表明, 极端嗜盐古菌中广泛存在有机溶质海藻糖和甘氨酸甜菜碱^[47-48], 并使用海藻糖调节高渗适应和保护作用^[51]。已知生物采用 5 种途径合成海藻糖, 分别是 OstAB、TreS、TreP、TreY 和 TreT 途径^[52]。从扎龙湿地盐碱湖生境获得的两株 RCII 甲烷古菌均编码丰富的海藻糖转运和合成的相关基因, 暗示甲烷古菌 RCII 采用与嗜盐古菌类似的嗜盐机制, 即通过降解胞外多糖、产生的海藻糖转运至胞内来适应盐碱环境。

综上所述, 本研究发现扎龙盐碱湿地表层土壤富含 RCII 甲烷古菌, 获得的 2 株 RCII 甲烷古菌的基因组均含有完整的氢还原二氧化碳代谢产甲烷途径的相关酶系, 说明它们可能通过氢还原二氧化碳产甲烷, 并通过转运与合成海藻糖适应盐碱环境。

REFERENCES

- [1] INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). Climate Change 2007: The Physical Science Basis[M]. Cambridge: Oxford Press, 2007.
- [2] 万忠娟, 于少鹏, 王海霞, 孙广友. 松嫩平原内陆盐碱湿地的类型特征及分布规律[J]. 湿地科学, 2003, 1(2): 141-146.
WAN ZJ, YU SP, WANG HX, SUN GY. The types and characteristics of inland saline-alkaline wetland in Songnen plain[J]. Wetland Science, 2003, 1(2): 141-146 (in Chinese).
- [3] 杨帆, 王志春, 肖焯. 冬季结冰灌溉对苏打盐碱土水盐变化的影响[J]. 地理科学, 2012, 32(10): 1241-1246.
YANG F, WANG ZC, XIAO Y. Effect of freezing water irrigation on the changes of soil water and salt in saline-sodic soil area[J]. Scientia Geographica Sinica, 2012, 32(10): 1241-1246 (in Chinese).
- [4] LIU FQ, ZHANG YP, LIANG H, GAO DW. Long-term harvesting of reeds affects greenhouse gas emissions and microbial functional genes in alkaline wetlands[J]. Water Research, 2019, 164: 114936.

- [5] ZHANG YP, LIU FQ, LIANG H, GAO DW. Mediative mechanism of freezing/thawing on greenhouse gas emissions in an inland saline-alkaline wetland: a metagenomic analysis[J]. *Microbial Ecology*, 2022: 1-12.
- [6] 班巧英, 刘廉宇, 李建政, 张立国. OLR 对 ABR 沿程格室甲烷发酵特征的影响[J]. *环境科学学报*, 2020, 40(6): 2150-2156.
- BAN QY, LIU LY, LI JZ, ZHANG LG. Effect of OLR on methane fermentation of each compartment in ABR[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2020, 40(6): 2150-2156 (in Chinese).
- [7] CONRAD R. Importance of hydrogenotrophic, acetoclastic and methylotrophic methanogenesis for methane production in terrestrial, aquatic and other anoxic environments: a mini review[J]. *Pedosphere*, 2020, 30(1): 25-39.
- [8] LEADBETTER JR, BREZNAK JA. Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(10): 3620-3631.
- [9] BRÄUER SL, BASILIKO N, SILJANEN HMP, ZINDER SH. Methanogenic archaea in peatlands[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2020, 367(20): fnaa172.
- [10] FERRY JG, KASTEAD KA. *Methanogenesis*[M]// *Archaea*. Washington DC: ASM Press, 2014: 288-314.
- [11] FERRY JG. Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, 23(1): 13-38.
- [12] LANG K, SCHULDES J, KLINGL A, POEHLEIN A, DANIEL R, BRUNEA A. New mode of energy metabolism in the seventh order of methanogens as revealed by comparative genome analysis of "*Candidatus* methanoplasma termitum"[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(4): 1338-1352.
- [13] MAYUMI D, MOCHIMARU H, TAMAKI H, YAMAMOTO K, YOSHIOKA H, SUZUKI Y, KAMAGATA Y, SAKATA S. Methane production from coal by a single methanogen[J]. *Science*, 2016, 354(6309): 222-225.
- [14] ZHOU Z, ZHANG CJ, LIU PF, FU L, LASO-PÉREZ R, YANG L, BAI LP, LI J, YANG M, LIN JZ, WANG WD, WEGENER G, LI M, CHENG L. Non-syntrophic methanogenic hydrocarbon degradation by an archaeal species[J]. *Nature*, 2022, 601(7892): 257-262.
- [15] LIU YQ, PRISCU JC, XIONG JB, CONRAD R, VICK-MAJORS T, CHU HY, HOU JZ. Salinity drives archaeal distribution patterns in high altitude lake sediments on the Tibetan Plateau[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(3): fiw033.
- [16] 任秘坊, 李凌燕, 陈琳, 邢婷婷, 刘勇勤, 东秀珠. 青藏高原三个盐碱湖的产甲烷菌群和产甲烷代谢途径分析[J]. *微生物学报*, 2020, 60(1): 161-171.
- REN MF, LI LY, CHEN L, XING TT, LIU YQ, DONG XZ. Methanogen communities and predominant methanogenic pathways in three saline-alkaline lakes on the Tibetan Plateau[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(1): 161-171 (in Chinese).
- [17] SOROKIN DY, MAKAROVA KS, ABBAS B, FERRER M, GOLYSHIN PN, GALINSKI EA, CIORDIA S, MENA MC, MERKEL AY, WOLF YI, van LOOSDRECHT MCM, KOONIN EV. Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17081.
- [18] SOROKIN DY, ABBAS B, GELEIJNSE M, PIMENOV NV, SUKHACHEVA MV, van LOOSDRECHT MCM. Methanogenesis at extremely haloalkaline conditions in the soda lakes of Kulunda Steppe (Altai, Russia)[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(4): fiv016.
- [19] KOTSYURBENKO OR, CHIN KJ, GLAGOLEV MV, STUBNER S, SIMANKOVA MV, NOZHEVNIKOVA AN, CONRAD R. Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(11): 1159-1173.
- [20] YAVITT JB, YASHIRO E, CADILLO-QUIROZ H, ZINDER SH. Methanogen diversity and community composition in peatlands of the central to northern Appalachian Mountain region, North America[J]. *Biogeochemistry*, 2012, 109(1): 117-131.
- [21] YE WJ, LIU XL, LIN SQ, TAN J, PAN JL, LI DT, YANG H. The vertical distribution of bacterial and archaeal communities in the water and sediment of Lake Taihu[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(2): 263-276.
- [22] CADILLO-QUIROZ H, YASHIRO E, YAVITT JB, ZINDER SH. Characterization of the archaeal community in a minerotrophic fen and terminal restriction fragment length polymorphism-directed isolation of a novel hydrogenotrophic methanogen[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(7): 2059-2068.

- [23] BASILIKO N, YAVITT JB, DEES PM, MERKEL SM. Methane biogeochemistry and methanogen communities in two northern peatland ecosystems, New York State[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2003, 20(6): 563-577.
- [24] KOCH K, KNOBLAUCH C, WAGNER D. Methanogenic community composition and anaerobic carbon turnover in submarine permafrost sediments of the Siberian Laptev Sea[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(3): 657-668.
- [25] MONDAV R, WOODCROFT BJ, KIM EH, McCALLEY CK, HODGKINS SB, CRILL PM, CHANTON J, HURST GB, VerBERKMOES NC, SALESKA SR, HUGENHOLTZ P, RICH VI, TYSON GW. Discovery of a novel methanogen prevalent in thawing permafrost[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3212.
- [26] WANG WJ, LIANG H, LI F, SU HH, LI HJ, GAO DW. Water level of inland saline wetlands with implications for CO₂ and CH₄ fluxes during the autumn freeze-thaw period in Northeast China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2023, 30(17): 50125-50133.
- [27] 李红艳, 章光新, 李绪谦, 高蕊, 邓春暖. 扎龙湿地水质净化机理分析[J]. *地理科学*, 2012, 32(1): 87-93. LI HY, ZHANG GX, LI XQ, GAO R, DENG CN. Analysis on water purification mechanism of Zhalong wetland[J]. *Scientia Geographica Sinica*, 2012, 32(1): 87-93 (in Chinese).
- [28] 王文锋, 罗金明, 王永洁, 高忠彦, 逢世良. 从小尺度探讨扎龙盐沼湿地的持水性特征[J]. *齐齐哈尔大学学报(自然科学版)*, 2010, 26(6)71-75. WANG WF, LUO JM, WANG YJ, GAO ZY, PANG SL. Water conservation function in Zhalong saline wetland at local scale[J]. *Journal of Qiqihar University (Natural Science Edition)*, 2010, 26(6)71-75 (in Chinese).
- [29] WEI SP, CUI HP, ZHANG YC, SU X, DONG HL, CHEN F, ZHU YH. Comparative evaluation of three archaeal primer pairs for exploring archaeal communities in deep-sea sediments and permafrost soils[J]. *Extremophiles*, 2019, 23(6): 747-757.
- [30] PEI CX, MAO SY, CHENG YF, ZHU WY. Diversity, abundance and novel 16S rRNA gene sequences of methanogens in rumen liquid, solid and epithelium fractions of Jinnan cattle[J]. *Animal*, 2010, 4(1): 20-29.
- [31] WRIGHT ADG, WILLIAMS AJ, WINDER B, CHRISTOPHERSEN CT, RODGERS SL, SMITH KD. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in western Australia[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(3): 1263-1270.
- [32] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [33] BOLGER AM, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [34] URITSKIY GV, DiRUGGIERO J, TAYLOR J. MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 1-13.
- [35] LI DH, LIU CM, LUO RB, SADAKANE K, LAM TW. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(10): 1674-1676.
- [36] ALNEBERG J, BJARNASON BS, de BRUIJN I, SCHIRMER M, QUICK J, IJAZ UZ, LAHTI L, LOMAN NJ, ANDERSSON AF, QUINCE C. Binning metagenomic contigs by coverage and composition[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(11): 1144-1146.
- [37] KANG DD, FROULA J, EGAN R, WANG Z. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities[J]. *PeerJ*, 2015, 3: e1165.
- [38] WU YW, SIMMONS BA, SINGER SW. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(4): 605-607.
- [39] PARKS DH, CHUVOCHINA M, CHAUMEIL PA, RINKE C, MUSSIG AJ, HUGENHOLTZ P. A complete domain-to-species taxonomy for bacteria and archaea[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(9): 1079-1086.
- [40] SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [41] ARAMAKI T, BLANC-MATHIEU R, ENDO H, OHKUBO K, KANEHISA M, GOTO S, OGATA H. KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold[J]. *Bioinformatics*, 2020, 36(7): 2251-2252.
- [42] THAUER RK, KASTER AK, SEEDORF H, BUCKEL W, HEDDERICH R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(8): 579-591.

- [43] OREN A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity[J]. *Saline Systems*, 2008, 4: 2.
- [44] DING RT, YANG N, LIU JG. The osmoprotectant switch of potassium to compatible solutes in an extremely halophilic archaea *Halorubrum kocurii* 2020YC7[J]. *Genes*, 2022, 13(6): 939.
- [45] OREN A. Bioenergetic aspects of halophilism[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 1999, 63(2): 334-348.
- [46] EPSTEIN W. The roles and regulation of potassium in bacteria[J]. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 2003, 75: 293-320.
- [47] YOUSSEF NH, SAVAGE-ASHLOCK KN, McCULLY AL, LUEDTKE B, SHAW EI, HOFF WD, ELSHAHED MS. Trehalose/2-sulfotrehalose biosynthesis and glycine-betaine uptake are widely spread mechanisms for osmoadaptation in the Halobacteriales[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(3): 636-649.
- [48] GOH F, JEON YJ, BARROW K, NEILAN BA, BURNS BP. Osmoadaptive strategies of the archaeon *Halococcus hamelinensis* isolated from a hypersaline stromatolite environment[J]. *Astrobiology*, 2011, 11(6): 529-536.
- [49] MARTIN DD, CIULLA RA, ROBERTS MF. Osmoadaptation in archaea[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(5): 1815-1825.
- [50] CSONKA LN. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress[J]. *Microbiological Reviews*, 1989, 53(1): 121-147.
- [51] DESMARAIS D, JABLONSKI PE, FEDARKO NS, ROBERTS MF. 2-sulfotrehalose, a novel osmolyte in haloalkaliphilic archaea[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(10): 3146-3153.
- [52] AVONCE N, MENDOZA-VARGAS A, MORETT E, ITURRIAGA G. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2006, 6(1): 109.