

DOI: 10.11766/trxb202101310062

宋玉翔, 王保战, 秦华, 匡璐, 唐修峰, 王欣欣, 周晓丽, 贾仲君. 土壤氨氧化古菌适应酸性胁迫的 ATP 酶基因分子进化研究[J]. 土壤学报, 2022, 59 (4): 1136–1147.

SONG Yuxiang, WANG Baozhan, QIN Hua, KUANG Lu, TANG Xiufeng, WANG Xinxin, ZHOU Xiaoli, JIA Zhongjun. Molecular Phylogeny Suggests a Key Role of ATPase Genes on Evolutionary Adaption of Soil Ammonia-oxidizing Archaea to Acid Stress[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59 (4): 1136–1147.

土壤氨氧化古菌适应酸性胁迫的 ATP 酶基因分子进化研究*

宋玉翔^{1, 2}, 王保战³, 秦 华⁴, 匡 璐³, 唐修峰⁵, 王欣欣⁶, 周晓丽⁷,
贾仲君^{1†}

(1. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 南京农业大学生命科学学院, 南京 210095; 4. 浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室, 杭州 311300; 5. 华东师范大学地理科学学院地理信息科学教育部重点实验室, 上海 200241; 6. 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 7. 盐城师范学院海洋与生物工程学院, 江苏盐城 224007)

摘 要: 氨氧化古菌 (Ammonia-oxidizing archaea, AOA) 被认为是酸性土壤硝化过程的主要微生物类群, 但 AOA 如何适应酸性胁迫并发挥作用一直是研究难点, 而 ATP 酶 (ATPase) 是能量代谢的关键, 其编码基因可能在 AOA 适应酸性胁迫过程中发生了趋同性演化。据此, 本研究针对 5 个不同种植年限的马尾松人工林酸性土壤 (15 a、24 a、45 a、55 a、63 a), 通过深度宏基因组测序获得 7 360 亿碱基对, 重构 AOA 氨单加氧酶 *amoA* 基因和 ATP 酶 A 亚基 (ATPase subunit A) 基因的系统发育进化谱系, 研究 AOA 适酸的分子机制。结果表明: 根据经典的 *amoA* 基因系统发育进化分类, 所有 5 个森林土壤中优势 AOA 主要包括 *Nitrososphaerales* 和 *Ca. Nitrosotaleales* 两大类群, 但 *Nitrososphaerales* 类群与中碱性土壤中的 AOA 古菌亲缘关系更近, 与嗜酸的 *Ca. Nitrosotaleales* 类群亲缘关系较远, 表明 *amoA* 基因的系统进化关系不能解释 *Nitrososphaerales* 在酸性土壤中的成功定殖。然而, 基于 ATPase subunit A 基因的系统进化分析则发现, 所有酸性森林土壤中嗜酸/耐酸氨氧化古菌均含有亲缘关系较近的 V-ATPase subunit A 基因, 表明氨氧化古菌可能通过基因水平转移获得 V-ATPase 基因适应酸性胁迫环境, 较好地解释了氨氧化古菌适应酸性胁迫的生境扩展规律。随林龄的增加, *Ca. Nitrosotaleales* 类群丰度先减少后增加, 而 *Nitrososphaerales* 类群丰度先增加后减少, 速效钾是显著影响 AOA 群落结构的重要环境因子。这些结果表明, 不同种植年限下酸性人工林土壤中氨氧化古菌种群发生了明显的分化, V-ATPase 基因水平转移可能是氨氧化古菌适应酸性胁迫的重要机制。

关键词: 宏基因组学; 酸性森林土壤; 氨氧化古菌; *amoA* 基因; ATP 酶基因

中图分类号: S154.36 **文献标志码:** A

* 国家自然科学基金项目 (41530857) 和浙江农林大学省部共建亚热带森林培育国家重点实验室开放基金 (KF2017-02) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41530857) and the Open Foundation of the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture (No. KF2017-02)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jia@issas.ac.cn

作者简介: 宋玉翔 (1995—), 男, 安徽定远人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: yxsong@issas.ac.cn

收稿日期: 2021-01-31; 收到修改稿日期: 2021-06-27; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2021-09-23

Molecular Phylogeny Suggests a Key Role of ATPase Genes on Evolutionary Adaption of Soil Ammonia-oxidizing Archaea to Acid Stress

SONG Yuxiang^{1,2}, WANG Baozhan³, QIN Hua⁴, KUANG Lu³, TANG Xiufeng⁵, WANG Xinxin⁶, ZHOU Xiaoli⁷, JIA Zhongjun^{1†}

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 4. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China; 5. Key Laboratory of Geographic Information Science (Ministry of Education), School of Geographic Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China; 6. College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 7. School of Marine and Biological Engineering, Yancheng Teachers University, Yancheng, Jiangsu 224007, China)

Abstract: 【Objective】Ammonia-oxidizing archaea (AOA) is considered the main microbial group catalyzing the nitrification process in acidic soils. However, how AOA adapts to acid stress remains largely uncertain, and we hypothesize that the gene encoding ATPase for microbial energy metabolism may likely play a key role in the adaption of AOA to acidic stress in these soils. 【Method】In this study, 736 billion base pairs were obtained by ultra-deep metagenomics sequencing of acidic soils of Masson pine plantations with five different planting years (15 a, 24 a, 45 a, 55 a, 63 a). The phylogenetic congruency between the AOA *amoA* gene and ATPase subunit A gene was reconstructed to study the molecular mechanism that may enable the acidophilic lifestyle of AOA. 【Result】The habitat expansion of AOA to the acidic environment cannot be explained by the phylogenetic evolutionary trajectory of canonic *amoA* genes encoding ammonia monooxygenase. The dominant AOA taxa from all 5 forest soils were phylogenetically affiliated with *Nitrososphaerales* and *Ca. Nitrosotaleales* based on *amoA* gene phylogeny. Even though *Nitrososphaerales* is more distantly related to *Ca. Nitrosotaleales*, it is more closely related to neutral AOA in alkaline soils. Therefore, the phylogenetic law based on the *amoA* gene cannot explain the successful colonization of *Nitrososphaerales* in acidic soils. The phylogeny of ATPase subunit A genes indicated a single clade of AOA in all acidic forest soils. These results thus suggest that during the habitat expansion and evolution of AOA, the *amoA* and ATPase genes could have experienced different selection pressures to cope with acid stress, and the V-ATPase gene may be obtained through horizontal gene transfer to adapt to acid stress. With the increase in forest age, the abundance of *Ca. Nitrosotaleales* group first decreased and then increased, while the abundance of *Nitrososphaerales* group first increased and then decreased. Also, it was observed that soil bioavailable potassium is an important environmental factor that significantly affects the structure of the AOA community. 【Conclusion】These results indicate that the AOA populations in acid plantation soils under different planting years were clearly differentiated, and the horizontal transfer of V-ATPase gene may be an important mechanism that enables AOA to survive acidic stress for the habitat expansion.

Key words: Metagenomics; Acid forest soil; Ammonia-oxidizing archaea; *amoA* gene; ATPase gene

地球上酸性土壤约占无冰陆地面积的 30% (pH < 5.5) [1], 而几乎所有微生物均须维持细胞内的中性稳态环境[2], 极可能通过消耗更多能量克服细胞膜内外巨大的质子梯度适应酸性胁迫。尤其是考虑到土壤中微生物数量巨大, 每克土壤可能栖息着数以亿计的微生物细胞, 其耐酸生理生长机制不仅是重要科学前沿, 也是农业生产的重要实践问题[3]。例如, 全球每年施用氮肥一亿多吨, 大量氮肥进入土壤后促进氨氧化微生物生长并释放质子, 进一步加剧土壤酸化, 可能导致微生物

功能丧失, 降低作物氮磷钾养分利用效率, 而我国氮肥施用量占全球比例高达 32%, 土壤酸化及其次生障碍问题尤为突出[4]。

氮素是所有生物生长的重要营养元素, 而微生物将氨氧化为亚硝酸盐则是地球氮素循环的关键限速步骤[5]。2005 年科学家发现海洋古菌具有氨氧化能力, 根本改变了地球氮循环的研究理念[6]。随后大量分子生态学研究表明, 氨氧化古菌 (Ammonia-oxidizing archaea, AOA) 是酸性土壤氨氧化的主要作用者, 并与海洋古菌 AOA 具有更近的系统发育进

化关系^[7-10],但其嗜酸机制报道较少。已有研究表明 AOA 含有脲酶,通过水解尿素获得底物氨分子,同时提高胞内 pH 适应酸性胁迫^[10-11],而基于纯菌株 *Ca. Nitrosotaleales devanaterre* 的研究则认为 AOA 嗜酸机制与已知的其他嗜酸菌基本一致^[12]。嗜酸菌维持胞内 pH 稳态机制主要包括:(1)形成具有极低质子渗透率的特殊细胞膜^[13];(2)通过吸收 K⁺等形成膜内正电位抑制 H⁺流入^[14];(3)通过谷氨酸和精氨酸脱羧作用消耗质子,然后将质子运出细胞等^[15]。值得注意的是,酸性土壤并非严格的极端环境,迄今尚未发现最适 pH 低于 3.0、严格意义的极端嗜酸氨氧化微生物。事实上,酸性土壤中极可能存在中性和碱性微域,分离到的氨氧化古菌通常为中度嗜酸菌^[8],最佳生长 pH 在 3.0~5.0 之间;而最近分离的菌株则为耐酸菌^[16],最佳生长 pH 高于 5.0,但在较低的 pH 下也能生长^[17]。

ATP 是所有生物生长的能量货币,而氨氧化古菌是严格化能无机自养菌,通过氧化氨态氮获得能量,同化无机碳自养生长。然而,值得注意的是,尽管氨单加氧酶 *amoA* 基因与核糖体 16S rRNA 基因均可作为氨氧化古菌和细菌的分类标靶,但二者均无法解释氨氧化古菌的生境偏好性。例如,通过稳定性同位素示踪氨氧化古菌核酸 DNA,2014 年我们首次发现酸性土壤中存在尚未可知的嗜酸/耐酸 AOA,这些古菌 AOA 在酸性土壤中分裂生殖产生新细胞被 ¹³C 所标记,具有较强的氨氧化活性,但其 *amoA* 基因和 16S rRNA 基因却与中性环境中的 *Nitrososphaerales* 古菌具有更近的亲缘关系,与已知的嗜酸古菌 *Ca. Nitrosotaleales* 截然不同^[18]。我们推测,与氨单加氧酶相比,古菌 AOA 的 ATPase 可能在适应酸性环境过程中发挥了更为重要的作用。事实上,质子进入 AOA 细胞与 ATP 酶(ATPase)密切相关,AOA 通过氨氧化与电子转移系统耦合产生质子动力,并通过 ATPase 合成生命活动所需能量 ATP^[19]。因此,编码 ATP 合酶的基因不仅是微生物能量产生的遗传基础,也可能在古菌 AOA 在适应酸性胁迫环境过程中发挥了重要作用。

ATPase 广泛存在于古菌、细菌和真核生物,主要包括古菌 A-ATPase,细菌、线粒体和叶绿体中常见的 F-ATPase,以及真核生物 V-ATPase 等^[20]。V-ATPase 是由 ATP 驱动的离子泵,最初是在细胞器膜中发现,其功能主要是酸化细胞器(如溶酶体、

核内体、液泡等),但越来越多的研究表明,V-ATPase 在多种细胞的质膜质子转运中发挥着重要作用^[21-23],如在巨噬细胞和中性粒细胞中,质膜 V-ATPase 能够将细胞内质子转运到细胞外,使细胞内保持中碱性 pH 稳态环境^[24]。古菌的 A-ATPase 在功能上类似于 F-ATPase,利用质子动力催化 ATP 合成(反应可逆),在结构上却更类似于 V-ATPase,并且一系列证据表明 V-ATPase 可能由 A-ATPase 演变而来^[20]。因此,古菌 A-ATPase 可能具有与质膜 V-ATPase 类似的调节细胞内 pH 的功能。我们最近的研究则表明,V-ATPase 可能在古菌 AOA 嗜酸过程中发挥了重要作用,将 AOA 的 V-ATPase 基因转入大肠杆菌异源表达,显著增加了大肠杆菌在低 pH 条件下的生长速率,表明 V-ATPase 是 AOA 适应酸性胁迫的关键模块^[25]。同时,所有陆地生态系统中性和碱性 AOA 菌株均含有 A-ATPase,而嗜酸/耐酸 AOA 菌株含有 V-ATPase。这一结果表明,尽管 ATPase 基因不能作为古菌 AOA 的系统发育分类分子标靶基因,但却能较好解释其生境分布规律^[25]。但这一结论是否具有普适性,尚缺乏明确证据。

据此,本研究利用深度宏基因组测序技术,针对浙江省建德市不同种植年限的马尾松人工林酸性土壤,研究不同林龄马尾松人工林土壤中 AOA 群落组成及影响 AOA 生态分化的环境因素,通过对 *amoA* 基因和 ATPase 基因的宏基因组数据分析,探究酸性环境中 AOA 与 ATPase 之间的关系,以期为 AOA 在地球环境中的生境扩张及遗传适应机制提供更多证据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

土壤样品采自浙江省建德市马尾松人工林(29.48°N, 119.28°E),土壤类型为凝灰岩发育的红壤。该区为亚热带海洋型季风气候,海拔约 200 m,年均气温 17.4℃,年均降雨量 1 600 mm。选择中龄林(15 a)、近熟林(24 a)、成熟林(45 a)、过熟林 I(55 a)、过熟林 II(63 a)的马尾松人工林土壤样品采样。具体设计如下:针对每一种年限,选择 3 个不同小区作为重复,空间间隔约 2 000 m,每个小区由 5 个土柱样品混匀而成,采样深度为 0~20

cm, 样品分成两份, 一份保存于 -20°C 用于提取土壤总 DNA, 另一份经风干、磨细、过 2 mm 筛、混匀后在 4°C 保存, 参照《土壤农化分析》^[26], 测定土壤理化指标。

1.2 土壤 DNA 提取和深度宏基因组测序

土壤微生物组总 DNA 使用 FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA) 试剂盒提取, 并通过 DNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit (QIAGEN, Germany) 试剂盒纯化获得高质量 DNA, 具体步骤参考相关操作指南。通过微量紫外分光光度计 (Nanodrop ND-1000) 测定 DNA 的浓度和纯度后, 保存于 -20°C 。

宏基因组测序主要通过 Illumina HiSeq 2000 平台完成。首先利用自动聚焦声波基因组剪切仪 Covaris M220, 将土壤总 DNA 随机打断为约 300 bp 的片段, 然后采用 TruSeq™ DNA Sample Prep Kit 试剂盒构建 PE (Paired-End) 文库, 最后通过 HiSeq 3000/4000 PE Cluster Kit 试剂盒进行桥式 PCR 反应, 质量检测合格后进行双末端 (Paired-End, PE) 测序。5 种不同种植年限的森林土壤及其 3 个生物学重复均开展了深度测序, 每个样品约 50G bp 原始数据, 共计获得约 750G bp 高通量数据。

高质量数据分析具体如下: 利用软件 SeqPrep 剪切序列 3'端和 5'端的 adaptor 序列, 随后删除所有长度小于 50 bp 的序列 reads; 通过软件 Sickle 去除平均质量值低于 20 以及含 N 碱基的序列 reads, 保留高质量的 reads, 每个样品最终得到约 49G bp 高质量数据。

1.3 高通量深度测序宏基因组注释策略及丰度分析

以 NCycDB 数据库中 AOA *amoA* 基因序列^[27]和最近发表的 ATP 酶 A 亚基 (ATPase subunit A) 蛋白序列^[25]为参考序列, 通过比对提取 $E \leq 10^{-4}$ 的序列 reads, 将其定义为 AOA 序列, 并使用 SPAdes 软件进行拼接组装为大片段重叠群 (contigs) (k -mer 设置为 21~29), 所有样品测序数据最后均一化成 50G bp 进行分析。

根据已有的 AOA 物种多样性报道^[25, 28], 构建 AOA *amoA* 基因和 ATPase subunit A 蛋白数据库。根据 AOA 的分类学文献^[28]对 AOA 进行分类。每个土壤样品中 AOA 的注释及其丰度计算方法如下: (1) 方法一: 首先利用 BLAST 将 contigs 与 *amoA* 基因数据库比对, 通过聚类软件 CD-HIT 以默认参数对

contigs (Identity ≥ 0.90 , Coverage ≥ 120) 进行聚类, 构建 *amoA* 基因系统发育树以进一步筛选并确定代表序列的物种分类地位, 进而确定聚类中各 contigs 所属类群。随后通过 BLAST 将 contigs 与 ATPase subunit A 蛋白数据库比对, 通过 ORF Finder 将核酸序列 (Identity ≥ 0.60 , Coverage ≥ 120) 翻译为蛋白序列并通过聚类软件 CD-HIT 以默认参数对蛋白序列聚类, 构建 ATPase subunit A 蛋白系统发育树筛选并确定代表序列的物种分类地位, 进而确定聚类中各 contigs 所属类群。统计用于拼接 contigs 序列上属于目标基因片段的 reads (参与拼接长度 ≥ 30 bp) 作为丰度。(2) 方法二: 利用 BLAST 将 contigs 分别与 *amoA* 基因和 ATPase subunit A 蛋白数据库比对, 得到候选 contigs, 然后分别通过构建 *amoA* 基因和 ATPase subunit A 蛋白系统发育树明确各候选 contigs 的物种分类地位, 丰度计算与方法一相同。(3) 方法三: 利用 BLAST 将 contigs 分别与 AOA *amoA* 基因和 ATPase subunit A 蛋白数据库比对, 根据比对结果确定 *amoA* contigs (Identity ≥ 0.90 , Coverage ≥ 120) 和 ATPase subunit A contigs (Identity ≥ 0.60 , Coverage ≥ 120) 的物种分类地位, 丰度计算与方法一相同。(4) 方法四: 直接利用 BLAST 获得短片段序列 reads ($E \leq 10^{-4}$), 分别与 *amoA* 基因和 ATPase subunit A 蛋白数据库比对, 根据比对结果确定 *amoA* reads (Identity ≥ 0.95 , Coverage ≥ 30) 和 ATPase subunit A reads (Identity ≥ 0.80 , Coverage ≥ 60) 的物种分类地位, 并将 reads 数均一化后作为其丰度。

1.4 氢氧化古菌分子系统发育树构建

利用 CD-HIT 软件对 *amoA* contigs 和 ATPase subunit A contigs 序列进行聚类, 软件设置为默认参数得到代表性序列。利用 MAFFT 软件根据默认参数对代表性序列进行比对, 然后用 IQ-TREE 软件构建 *amoA* 基因和 ATPase subunit A 蛋白系统发育树, 参数设置为 “-MFP -bb 1000”。系统发育树中的经典物种采用已有的纯菌株和富集物序列作为参考。

1.5 数据处理

利用 Microsoft Excel 2016 对数据进行前处理, IBM SPSS Statistics 20 进行差异显著性分析 (LSD 法, $\alpha=0.05$) 和 Spearman 分析; 利用 R 软件 vegan 包开展 Mantel 分析、ANOISM 分析; 利用 OriginPro 8.0 制作箱线图; 并利用软件 Adobe Illustrator CS5 优化调整。

2 结果

2.1 马尾松人工林土壤理化性质

人工种植导致马尾松林土壤性质发生显著变化。如表 1 所示, 低龄林 (15 a 和 24 a) 的土壤含水量显著大于高龄林土壤 (45 a、55 a 和 63 a)。与初始 15 a 中龄林土壤相比, 长期种植导致马尾松林土壤 pH、有机碳、全氮、水解性氮、速效钾含量均

呈下降趋势, 尤其在 63 a 过熟林 II 均达到统计显著性 ($P < 0.05$)。有效磷则表现出相反的规律, 与初始 15 a 中龄林土壤相比, 其含量呈增加趋势, 尤其在 63 a 过熟林 II 土壤, 从 $6.60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 增至 $17.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。此外, 与 45 a 成熟林相比, 55 a 和 63 a 土壤含水率、pH、有机碳、全氮和水解性氮均未有显著差异, 有效磷和速效钾均呈增加趋势并在 63 a 土壤具有统计显著性。

表 1 马尾松人工林土壤基本理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of *Pinus massoniana* plantation soil

龄组 Age group	含水率 Moisture/%	pH	有机碳 SOC/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	全氮 TN/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	水解性氮 HN/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	有效磷 AP/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	速效钾 AK/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
中龄林 ^① (15 a)	27.6±1.4a	4.70±0.21a	17.0±1.8a	1.44±0.12a	187±4a	6.60±1.84b	69.7±6.7a
近熟林 ^② (24 a)	27.0±3.0a	4.31±0.11b	14.6±0.7ab	1.18±0.17ab	140±23b	7.52±1.79b	57.7±4.0b
成熟林 ^③ (45 a)	15.3±0.9b	4.09±0.17b	15.4±3.4ab	0.95±0.33b	151±44ab	8.71±1.03b	21.7±1.5c
过熟林 I ^④ (55 a)	18.56±1.6b	4.04±0.15b	15.0±1.4ab	0.92±0.14b	134±10b	8.25±2.09b	57.3±2.5b
过熟林 II ^⑤ (63 a)	15.6±2.9b	4.17±0.11b	12.4±1.3b	0.88±0.13b	117±13b	17.0±6.14a	55.7±4.0b

注: 表中数据为平均值 ± 标准差 ($n=3$); 同一列无相同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。Note: Values were presented as mean ± standard deviation ($n=3$); Different letters in the same column indicate significant difference among five treatments ($P < 0.05$). The same below. ①Middle-age forest, ②Near-mature forest, ③Mature forest, ④Over-mature forest I, ⑤Over-mature forest II.

2.2 酸性土壤氨氧化古菌 *amoA* 基因和 ATPase subunit A 基因的趋同进化

针对 5 种土壤 3 个重复的 750G bp 高质量测序数据, 通过 4 种方法重构 *amoA* 基因和 ATPase subunit A 基因的系统发育进化规律。方法一、方法二和方法三均通过将高质量序列拼接为大片段 contigs 后, 构建系统发育进化关系或直接比对进行注释; 而方法四则通过直接分析高通量序列 reads 并注释。结果表明, 方法一注释策略最佳, 故选择方法一结果构建系统发育进化关系。

系统发育分析 *amoA* 基因发现其进化距离较远, 在分类学上归属于两个目, 分别为 *Ca.Nitrosotales* (NT) 和 *Nitrososphaerales* (NS)。而 NT 和 NS 目可进一步细分为 3 个亚类, NT- α 、NS- γ -2.3、NS- ζ 亚类, 这些类群占有 AOA 的丰度分别为 28.1%、60.3% 和 10.8%, 合计 99.2% (图 1a)。此外, 土壤中也检测到少量 NS- δ 亚类, 其丰度约为 0.9% (图 1a)。

然而, ATPase subunit A 基因分析则得到完全不同的结果, 土壤中优势 AOA 具有较高的序列亲缘相

似度, 均可归类为 V-ATPase 并占有序列 96.3%。采用 *amoA* 基因的物种命名并用斜体作为区分, 则发现 V-ATPase 可细分为 3 个亚类 NT- α 、NS- γ -2.3、NS- ζ 、其丰度分别为 28.1%、61.0%、7.2% (图 1b)。而仅有 3.8% 的序列可归类为 A-ATPase, 其 *amoA* 基因的分类地位为 NS 和 NP 目, 亚类为 NS- α 和 NP- γ 。

这些结果表明, V-ATPase 基因可能是古菌 AOA 适应酸性胁迫并发生趋同进化的分子基础。本研究中所有 5 种土壤均为酸性 ($\text{pH} < 5.0$), 而基于 *amoA* 基因的分类无法解释 AOA 古菌的酸性胁迫适应规律。如图 1a 所示, AOA 古菌 NS 目和 NT 目具有显著的系统进化分异, 前者占比高达 71.1%, 后者占比仅为 18.1%, 但前者的亲缘物种多见于中碱性土壤, 而后者的亲缘物种主要存在于酸性土壤。相反, ATPase subunit A 系统进化分析则发现, 96.3% 的 AOA 均可归类为 V-ATPase 古菌 AOA, 表明不同类型的古菌 AOA (NS 和 NT 目) 长期适应酸性胁迫过程中, 可能通过基因水平转移, 获得了相同/相似的 V-ATPase 基因适应酸性胁迫, 发生了趋同进化。

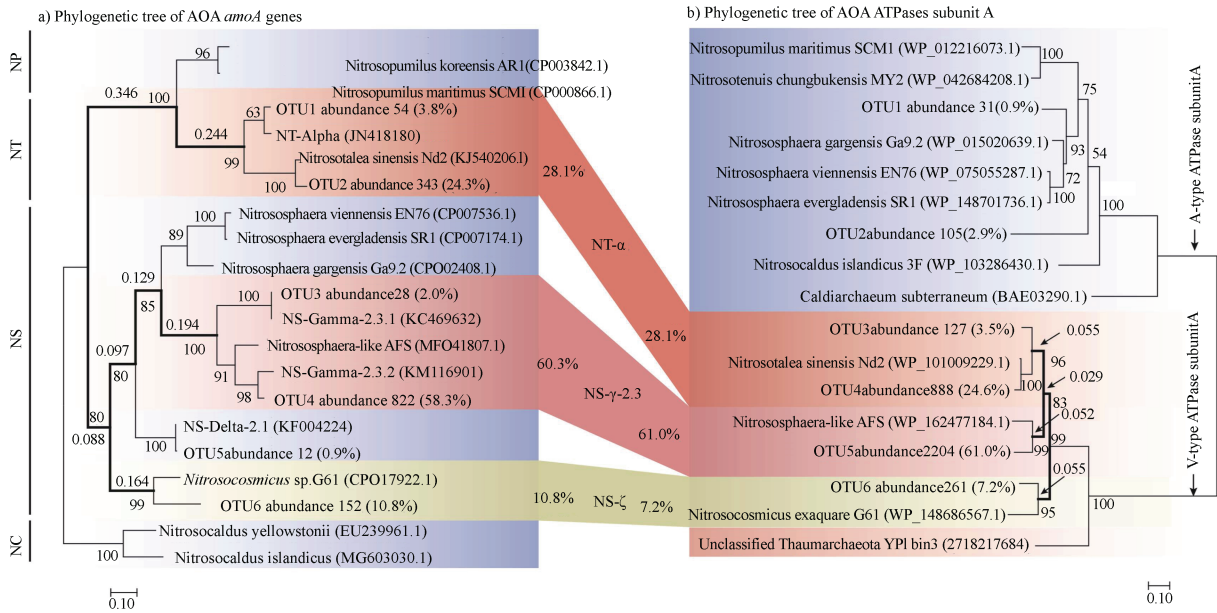


图 1 马尾松人工林土壤 AOA *amoA* 基因 (a) 和 ATPase subunit A (b) 系统发育进化树及趋同分析

Fig. 1 Phylogenetic tree and convergence analysis of AOA *amoA* gene (a) and ATPase subunit A (b) in *Pinus massoniana* plantation soil

2.3 不同种植年限下酸性森林土壤氨氧化古菌 *amoA* 和 ATPase subunit A 基因丰度变化

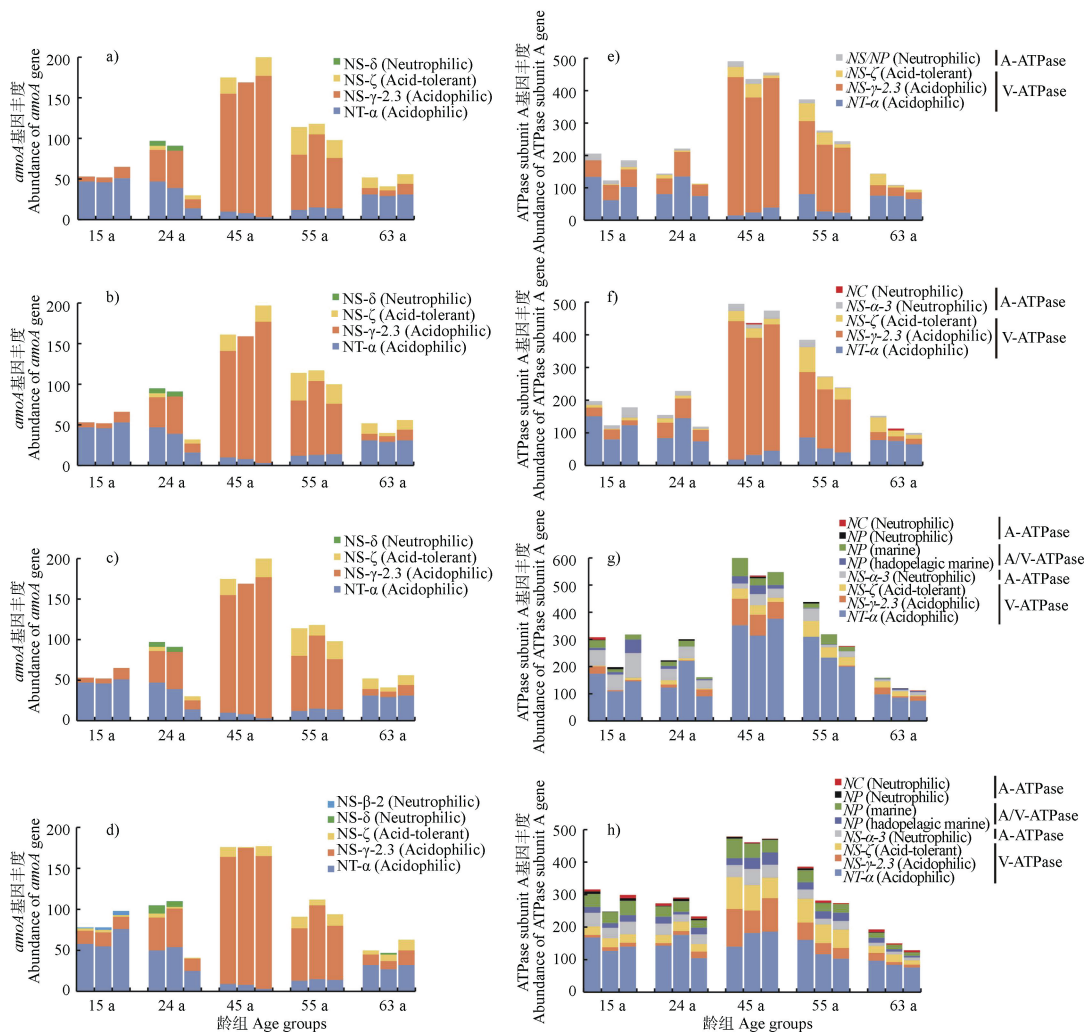
进一步在更精细化水平,研究了不同种植年限下酸性森林土壤 AOA *amoA* 和 ATPase subunit A 基因分化及其丰度变化规律(图 2)。针对 *amoA* 基因,四种注释方法均发现土壤中 *amoA* 基因具有较远的进化亲缘关系,在分类学上可归类为 NS 和 NT 两个 AOA 目。通过拼接 contigs 注释的方法一(图 2a)、方法二(图 2b)和方法三(图 2c),均发现 NS 目含有 3 个亚类 NS- γ -2.3、NS- ζ 和 NS- δ ,而通过直接注释高通量测序序列的方法四也发现了这三个亚类,并检测到一个数量上极为弱势的 NS- β (图 2d)。同时,所有方法均发现 NT 目仅有一个亚类 NT- α 。

尽管 AOA 古菌 ATPase subunit A 基因与 *amoA* 基因的亲缘进化规律明显不同(图 1),但在精细化分类水平 ATPase 基因的相对丰度则与 *amoA* 基因丰度有较为一致的规律。采用 *amoA* 基因的物种命名并用斜体作为区分,ATPase subunit A 占绝对优势的类群均为 NT- α 和 NS- γ -2.3。值得注意的是,四种分类方法针对 NT- α 和 NS- γ -2.3 具有不同的分类结果,与方法一(图 2e)和方法二(图 2f)相比,方法三(图 2g)和方法四(图 2h)将部分 NS- γ -2.3 亚类 AOA 也归类至 NT- α ,导致后者丰度相对较高。但由于这一分类不确定性仅存在于 NT- α 和 NS- γ -2.3 之间,对其相对丰度及本文结论无影响,故在本文中重点采

用方法一的数据。

amoA 分析结果均表明,NT- α 和 NS- γ -2.3 亚类是不同种植年限下马尾松林土壤中的优势 AOA 类群(图 2a),在不同种植年限的 5 种土壤中,其总丰度分别为 100% (15 a 中龄林)、88.5% (24 a 近熟林)、92.4% (45 a 成熟林)、77.6% (55 a 过熟林 I) 和 80.5% (63 a 过熟林 II)。其中,NT- α 亚类占比分别为 85.2%、46.0%、3.98%、12.5%和 61.9%;而 NS- γ -2.3 亚类占比分别为 14.8%、42.5%、88.4%、66.4%和 18.6%(图 2a)。此外,NS- ζ 丰度在中龄林土壤(15 a)中低于检测限,但随着种植年限增加而增加,其相对丰度在过熟林 I (55 a) 土壤最高为 21.1%。

ATPase subunit A 基因分析结果也发现 NT- α 和 NS- γ -2.3 亚类是土壤 AOA 优势类群(图 2e),在不同种植年限的 5 种土壤中,其总丰度分别为 87.8% (15 a 中龄林)、94.1% (24 a 近熟林)、91.1% (45 a 成熟林)、86.0% (55 a 过熟林 I) 和 86.4% (63 a 过熟林 II)。其中,NT- α 和 NS- γ -2.3 的占比分别为:15 a 中龄林 (57.0%和 30.7%)、24 a 近熟林 (61.2%和 32.9%)、45 a 成熟林 (5.70%和 85.4%)、55 a 过熟林 I (13.6%和 72.4%) 和 63 a 过熟林 II (63.6%和 22.8%)(图 2e)。此外,NS- ζ 丰度随着种植年限增加而增加,其相对丰度由 15 a 中龄林土壤 1.8%增加至 55 a 过熟林 II 土壤的 12.8%。



注：(a)、(b)、(c)、(d) 分别是通过方法一、方法二、方法三、方法四得出的 AOA *amoA* 基因分类及其丰度；(e)、(f)、(g)、(h) 分别是通过方法一、方法二、方法三、方法四得出的 ATPase subunit A 基因分类及其丰度。Note: (a), (b), (c), (d) are the AOA *amoA* gene classifications and their abundances obtained by method 1, method 2, method 3, and method 4 respectively; (e), (f), (g), (h) are the classification and abundance of ATPase subunit A gene obtained by method 1, method 2, method 3, and method 4 respectively. NP, NT, NS, NC are the *Nitrosopumilales*, *Ca. Nitrosotales*, *Nitrososphaerales*, and *Ca. Nitrosocadales* respectively.

图 2 不同注释方法马尾松人工林土壤 AOA *amoA* 基因和 ATPase subunit A 基因丰度

Fig. 2 The results of different annotation methods for AOA *amoA* gene and ATPase subunit A gene in *Pinus massoniana* plantation soil

总体而言，系统发育进化发现酸性土壤中占据绝对优势 AOA 的 ATPase subunit A 序列具有高度同源性，这些 NT- α 和 NS- γ -2.3 亚类与已知的嗜酸/耐酸 AOA 相似并可归类为 V-ATPase。同时，这些 AOA 的 *amoA* 基因同源性较低，表明 AOA 古菌可能通过基因水平转移获得 V-ATPase 基因适应酸性胁迫。

2.4 土壤氨氧化古菌分异的环境驱动机制

在微生物分类学不同水平，如纲 (Class)、目 (Order)、亚支 (Subclade)，将不同林龄马尾松人工林土壤 AOA 分类，计算其相对丰度的变异系数并与

土壤理化性质进行相关分析。结果表明，AOA *amoA* 基因和 ATPase subunit A 基因分类越细，其丰度的变异系数越大，即重复间变异越大 (图 3a、图 3b)。同时，土壤理化因子的变异系数低于 AOA 类群的变异系数。Spearman 统计分析发现，AOA 类群丰度与其变异系数极显著负相关 ($r = -0.679$, $P < 0.001$)。例如，在亚支分类水平，当 AOA 古菌 *amoA* 基因和 ATPase subunit A 基因丰度低于 40 个序列 reads，其变异系数高达 34.4%~86.7%，而当 AOA 丰度高于 40 个 reads，其变异系数集中在 9.07%~33.9%之间

(图 3c)。

Spearman 分析不同 AOA 基因型与土壤理化性质发现, 不同环境要素对 AOA 基因型的影响不同。pH、速效钾与 NT- α 亚支极显著正相关, 但与 NS- γ -2.3 和 NS- ζ 亚支显著或极显著负相关(表 2)。

利用总 *amoA* 基因型研究 AOA 群落多样性, 通过 ANOISM 分析, 发现不同林龄马尾松人工林土壤 AOA 群落存在显著差异 ($r=0.83$, $P<0.001$), 进一步 Mantel 分析发现, 速效钾是影响 AOA 群落结构的最重要环境因子 ($r=0.56$, $P<0.001$)。

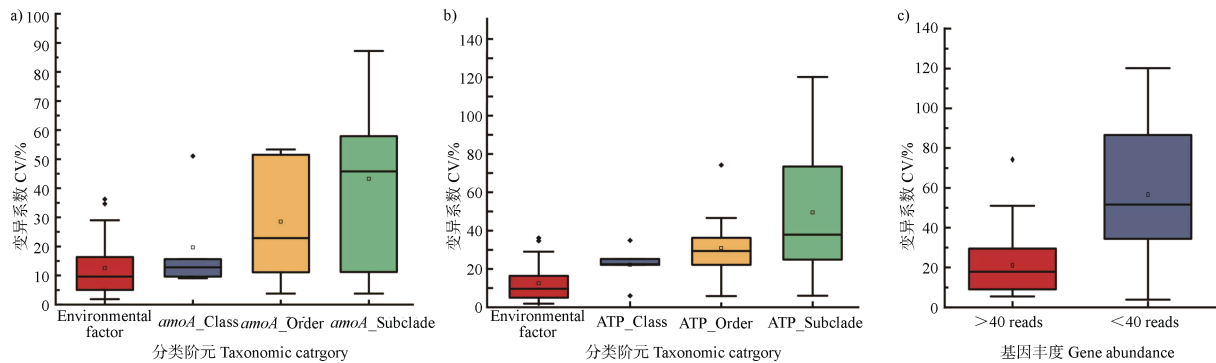


图 3 不同分类水平下 AOA *amoA* 基因 (a) 和 ATPase subunit A (b) 丰度变异系数及其与丰度关系 (c)

Fig. 3 Coefficient of variation of abundance of AOA *amoA* gene (a) and ATPase subunit A (b) at different classification levels and their relationship with abundance (c)

表 2 不同马尾松种植年限下氨氧化古菌 AOA 类群与土壤理化性质的相关性

Table 2 Relationship of AOA groups with soil physicochemical properties

AOA	含水率 Moisture	pH	有机碳 SOC	全氮 TN	水解性氮 HN	有效磷 AP	速效钾 AK
NT- α (Acidophilic)	0.65**	0.75**	0.20	0.48	0.25	-0.12	0.65**
NS- γ -2.3 (Acid-tolerant)	-0.36	-0.60*	0.00	-0.39	-0.01	-0.06	-0.71**
NS- ζ (Acid-tolerant)	-0.49	-0.89**	-0.51	-0.78**	-0.46	0.37	-0.57*
NS- δ (Neutrophilic)	0.41	0.28	0.14	0.23	-0.05	-0.05	-0.02
Total <i>amoA</i> gene	-0.29	-0.48	0.12	-0.35	0.12	-0.02	-0.67**

注: *表示显著相关 ($P<0.05$); **表示极显著相关 ($P<0.001$)。Note: * indicates significant correlation ($P<0.05$); ** indicates a very significant correlation ($P<0.001$).

3 讨论

已有研究表明, 酸性土壤中存在大量尚未未知的嗜酸/耐酸氨氧化古菌, 基于经典的 16S rRNA 基因和氨单加氧酶 *amoA* 基因系统发育进化分析均表明, 这些 AOA 与已知的嗜酸性 AOA 古菌亲缘关系较远, 与中碱性环境中的古菌 AOA 亲缘关系较近^[29-31], AOA 古菌在酸性环境中的生境分布规律与

致。我们通过稳定同位素核酸探针技术, 首次系统 16S rRNA 和 *amoA* 基因的系统发育进化关系并不一阐述了这一现象, 并提供了这些未知 AOA 在酸性环境中分裂增殖的明确证据^[18]。同时, 几乎所有微生物细胞内部均为中性稳态环境, 为了在酸性条件下生长, AOA 必须克服细胞膜内外巨大的 pH 梯度, 消耗更多能量适应酸性胁迫。我们前期的研究发现能量货币 ATP 合成相关的基因极可能发生水平转移, 是酸性土壤中未知 AOA 及已知嗜酸性 AOA 适

应酸性胁迫环境的重要机制^[25],但其普适性尚需进一步证据。本研究则针对不同种植年限的马尾松人工林酸性土壤,发现 V-ATPase 基因水平转移可能是古菌 AOA 适应酸性胁迫环境的重要机制。

3.1 土壤氨氧化古菌适应酸性胁迫机制分析

通过对马尾松人工林土壤总 DNA 深度宏基因组测序结果分析,表明 V-ATPase 基因协助 AOA 适应酸性胁迫机制可能具有普适性。目前 AOA 耐酸机制研究主要集中在 NT 类群,推测其可能通过一些典型机制适应酸性环境^[12]。但是,已知嗜酸 NT 类群四株 AOA 古菌研究表明,其中有两种菌株不含有与钾离子代谢相关的基因,说明通过吸收钾离子抑制质子渗透的耐酸机制并不适用于所有嗜酸 NT 类群^[32]。此外,酸性土壤中存在丰度更高的与 NT 类群具有较远亲缘关系的 NS- γ -2.3 类群,目前尚未有纯菌株报道,其耐酸机制尚不清楚。因此,不同 AOA 类群适应酸性胁迫的机制是否具有共性,仍然需要进一步研究。本研究通过深度宏基因组测序,对 AOA *amoA* 基因和 ATPase subunit A 基因分析发现,在马尾松人工林酸性土壤中,各酸性 AOA 类群的 V-ATPase 比例与其对应的 *amoA* 基因比例基本相同,而不同林龄土壤中两者的变化规律也基本相同。这一结果从生境适应性角度,提供了 V-ATPase 基因水平转移的重要证据,表明 V-ATPase 基因是 NT 类群和 NS- γ -2.3 类群适应酸性胁迫环境的重要机制。

3.2 马尾松人工林种植年限对土壤氨氧化古菌群落分化的影响规律

人工林种植可能促进了酸性 AOA 的种群分化。通过深度宏基因组测序发现,马尾松人工林酸性土壤中 AOA 主要是 NT 和 NS- γ -2.3 类群,并且随林龄增加,NT 类群丰度先减少后增加,而 NS- γ -2.3 类群丰度先增加后减少,这可能是不同林龄土壤理化性质差异导致的。有研究表明 pH 是影响 AOA 群落的重要因子^[33-34],但是本研究通过 Mantel 分析发现,速效钾与 AOA 群落结构相关性最强。这可能是由于本研究样品皆为酸性土壤,pH 在小范围变化内对 AOA 影响有限,而钾离子与 AOA 适应酸性胁迫的代谢活动密切相关,因此,速效钾显著影响酸性马尾松人工林土壤 AOA 群落结构。进一步通过 Spearman 相关分析发现,NT 类群与环境因子显著

正相关,而 NS- γ -2.3 类群则与环境因子显著负相关,导致这种差异的原因以及环境因子对 AOA 群落的生态分化影响仍需进一步研究。本研究同时发现,不同林龄马尾松人工林土壤 AOA 群落结构组间差异显著大于组内差异,当同一林龄土壤样品重复间的环境因子变异程度较小时,不同林龄马尾松人工林土壤中 AOA 类群丰度随着分类越细,重复间变异程度越大,且通过 Spearman 分析发现,AOA 丰度与变异系数极显著负相关($r = -0.679$, $P < 0.001$)。由此可以推测,当采集样品的真重复间环境因子相差较小且在较大级别进行微生物分类时,生物学重复的单个样品深度宏基因组测序结果也能反映该样品中古菌的整体情况。

3.3 宏基因组测序氨氧化古菌注释策略的差异分析

针对马尾松人工林酸性土壤总 DNA 深度宏基因组测序,研究发现通过不同注释策略对 *amoA* 基因和 ATPase subunit A 基因的注释结果具有显著差异。Illumina 测序技术是目前宏基因组研究中最为广泛应用的测序方法,而在对测序结果进行注释时,一般是通过 reads^[35-37]或 contigs^[38-40]与数据库比对进行物种分类。本研究通过对马尾松人工林土壤总 DNA 使用 Illumina HiSeq 2000 测序平台进行双末端测序,对总共约 750G bp 原始数据质控、组装获得高质量序列后,使用不同方法对 AOA 注释。针对 *amoA* 基因注释,无论直接将 reads 或 contigs 与数据库比对,还是通过这些序列构建系统发育确定其进化分类地位,其结果基本一致。然而,ATPase subunit A 基因注释则必须通过构建系统发育进化树。造成这种差异的可能原因是:氨氧化古菌 *amoA* 基因和 ATPase subunit A 基因注释差异可能取决于数据库中不同基因的丰富度。氨单加氧酶 *amoA* 基因一直是氨氧化古菌分子生态研究的分子标靶,数据库中数量高达 33 256 个 *amoA* 基因序列,聚类分析则可得到 1 190 个 *amoA* 基因代表序列^[28]。本研究以这些代表序列为基础构建 *amoA* 基因数据库,最大程度涵括所有 AOA 类群信息。相反,由于古菌 AOA 的 ATPase 研究较少,本文构建的 ATPase subunit A 数据库只含有 215 个序列,仅 57 个序列属于 AOA,其中 25 个序列与陆地 AOA 相关,同时,ATPase 基因作为系统发育分类的意义有限。因此,

本研究缺少足够的 AOA 古菌 ATPase subunit A 序列信息，导致不同 ATPase subunit A 注释方法结果差异较大。

此外，大片段基因拼接也可能产生误差，尤其是 AOA 的 ATPase subunit A 序列更长，拼接难度更大。尽管高通量测序导致微生物学、生态学、进化生物学等学科交叉发展态势迅猛^[41]，但短读取长度始终是二代测序最明显的缺点^[42]。借助各种生物信息学工具可将短序列组装至原始长度模板中，也可能对基于序列的生物学研究准确性产生重要影响。本研究中拼接组装得到的 AOA 古菌 V-ATPase subunit A 的大片段 contigs 均长为 528 bp，与 *amoA* contigs 均长 511 bp 几乎相同，而 AOA 的 ATPase subunit A 序列更长，约是 *amoA* 基因的 2.8 倍。由于酸性土壤的中性 AOA 数量较少，导致拼接出的 AOA 古菌 A-ATPase subunit A contigs 均长更短(310 bp)，因此，即便通过构建系统发育进化关系，也很难准确对古菌 AOA 进行分类(图 1b)。因此，尽管高通量测序技术为研究环境微生物和微生物生态学提供了强有力的工具，并已出现了大量的算法用于海量的宏基因组数据分析，然而，目前尚没有一种计算软件可解决所有问题，针对各种生境中丰度各异、类群多样的微生物区系仍需针对具体问题构建新的算法。

4 结 论

基于 16S rRNA 基因和 *amoA* 基因的氨氧化古菌系统发育分类地位基本一致，是氨氧化古菌多样性研究的经典靶基因。针对 5 个不同种植年限的马尾松人工林酸性土壤，通过深度宏基因组测序并重构古菌 AOA 的氨单加氧酶 *amoA* 基因系统发育，发现所有酸性森林土壤中主要包括 *Ca. Nitrosotaleales* 和 *Nitrososphaerales* 古菌，前者是已知的嗜酸氨氧化菌，而后者则与已知嗜酸的 *Ca. Nitrosotaleales* 亲缘关系较远，却与中碱性土壤中的 AOA 亲缘进化更近，表明 *amoA* 基因系统发育进化无法解释 *Nitrososphaerales* 在酸性森林土壤中的定殖。然而，所有这些类群均含有亲缘关系高度相近的 V-ATPase subunit A 基因，表明氨氧化古菌可能通过基因水平转移获得 V-ATPase 基因适应酸性胁迫。同时，不同

种植年限下酸性人工林土壤中氨氧化古菌种群发生了明显的分化，速效钾是显著影响 AOA 群落结构的重要环境因子。

参考文献 (References)

- [1] Von Uexküll H R, Mutert E. Global extent, development and economic impact of acid soils[J]. *Plant and Soil*, 1995, 171 (1): 1—15.
- [2] Slonczewski J L, Fujisawa M, Dopson M, et al. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and Archaea[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2009, 55: 1—79, 317.
- [3] Yu C Q, Huang X, Chen H, et al. Managing nitrogen to restore water quality in China[J]. *Nature*, 2019, 567 (7749): 516—520.
- [4] Guo J H, Liu X J, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. *Science*, 2010, 327 (5968): 1008—1010.
- [5] Galloway J N, Townsend A R, Erismann J W, et al. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions[J]. *Science*, 2008, 320 (5878): 889—892.
- [6] Könneke M, Bernhard A E, de la Torre J R, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon[J]. *Nature*, 2005, 437 (7058): 543—546.
- [7] Zhang L M, Hu H W, Shen J P, et al. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6 (5): 1032—1045.
- [8] Lehtovirta-Morley L E, Stoecker K, Vilcinskis A, et al. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 (38): 15892—15897.
- [9] Nicol G W, Leininger S, Schleper C, et al. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (11): 2966—2978.
- [10] Lu L, Han W Y, Zhang J B, et al. Nitrification of archaeal ammonia oxidizers in acid soils is supported by hydrolysis of urea[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6 (10): 1978—1984.
- [11] Lu L, Jia Z J. Urease gene-containing Archaea dominate autotrophic ammonia oxidation in two acid soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15 (6): 1795—1809.
- [12] Lehtovirta-Morley L E, Sayavedra-Soto L A, Gallois N, et al. Identifying potential mechanisms enabling acidophily in the ammonia-oxidizing archaeon

- “*Candidatus Nitrosotalea devanaterrea*”[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82 (9): 2608—2619.
- [13] Konings W N, Albers S V, Koning S, et al. The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and Archaea in extreme environments[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, 81 (1/2/3/4): 61—72.
- [14] Baker-Austin C, Dopson M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles[J]. *Trends in Microbiology*, 2007, 15 (4): 165—171.
- [15] Castanie-Cornet M P, Penfound T A, Smith D, et al. Control of acid resistance in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181 (11): 3525—3535.
- [16] Lehtovirta-Morley L E, Ge C R, Ross J, et al. Characterisation of terrestrial acidophilic archaeal ammonia oxidisers and their inhibition and stimulation by organic compounds[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 89 (3): 542—552.
- [17] Johnson D B, Schippers A. Editorial: Recent advances in acidophile microbiology : Fundamentals and applications[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 428.
- [18] Wang B Z, Zheng Y, Huang R, et al. Active ammonia oxidizers in an acidic soil are phylogenetically closely related to neutrophilic archaeon[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80 (5): 1684—1691.
- [19] Stahl D A, de la Torre J R. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66: 83—101.
- [20] Zubareva V M, Lapashina A S, Shugaeva T E, et al. Rotary ion-translocating ATPases/ATP synthases : Diversity, similarities, and differences[J]. *Biochemistry: Moscow*, 2020, 85 (12/13): 1613—1630.
- [21] Forgac M. Vacuolar ATPases: Rotary proton pumps in physiology and pathophysiology[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8 (11): 917—929.
- [22] Wagner C A, Finberg K E, Breton S, et al. Renal vacuolar H⁺-ATPase[J]. *Physiological Reviews*, 2004, 84 (4): 1263—1314.
- [23] Beyenbach K W, Wicczorek H. The V-type H⁺ ATPase: Molecular structure and function, physiological roles and regulation[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209 (4): 577—589.
- [24] Nanda A, Brumell J H, Nordström T, et al. Activation of proton pumping in human neutrophils occurs by exocytosis of vesicles bearing vacuolar-type H⁺-ATPases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (27): 15963—15970.
- [25] Wang B Z, Qin W, Ren Y, et al. Expansion of Thaumarchaeota habitat range is correlated with horizontal transfer of ATPase operons[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13 (12): 3067—3079.
- [26] Bao S D. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000. [鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000.]
- [27] Tu Q C, Lin L, Cheng L, et al. nCycDB: a curated integrative database for fast and accurate metagenomic profiling of nitrogen cycling genes[J]. *Bioinformatics*, 2019, 35 (6): 1040—1048.
- [28] Alves R J E, Minh B Q, Urich T, et al. Unifying the global phylogeny and environmental distribution of ammonia-oxidising archaea based on *amoA* genes[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1517.
- [29] He J Z, Shen J P, Zhang L M, et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (9): 2364—2374.
- [30] Gubry-Rangin C, Hai B, Quince C, et al. Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 (52): 21206—21211.
- [31] Huang R, Wu Y C, Zhang J B, et al. Nitrification activity and putative ammonia-oxidizing archaea in acidic red soils[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2012, 12 (3): 420—428.
- [32] Herbold C W, Lehtovirta-Morley L E, Jung M Y, et al. Ammonia-oxidising archaea living at low pH: Insights from comparative genomics[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19 (12): 4939—4952.
- [33] Xi R J, Long X E, Huang S, et al. pH rather than nitrification and urease inhibitors determines the community of ammonia oxidizers in a vegetable soil[J]. *AMB Express*, 2017, 7 (1): 129.
- [34] Gubry-Rangin C, Kratsch C, Williams T A, et al. Coupling of diversification and pH adaptation during the evolution of terrestrial Thaumarchaeota[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112 (30): 9370—9375.
- [35] Petersen T N, Lukjancenko O, Thomsen M C F, et al. MGmapper: Reference based mapping and taxonomy annotation of metagenomics sequence reads[J]. *PLoS One*, 2017, 12 (5): e0176469.
- [36] Chen J R, McIlroy S E, Archana A, et al. A pollution gradient contributes to the taxonomic, functional, and resistome diversity of microbial communities in marine sediments[J]. *Microbiome*, 2019, 7 (1): 104.
- [37] Müller A, Hundt C, Hildebrandt A, et al. MetaCache: context-aware classification of metagenomic reads using minhashing[J]. *Bioinformatics*, 2017, 33 (23): 3740—3748.
- [38] Yu C D, Hou L J, Zheng Y L, et al. Evidence for complete nitrification in enrichment culture of tidal sediments and

- diversity analysis of clade a comammox *Nitrospira* in natural environments[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102 (21): 9363—9377.
- [39] Levy Karin E, Mirdita M, Söding J. MetaEuk-sensitive, high-throughput gene discovery, and annotation for large-scale eukaryotic metagenomics[J]. *Microbiome*, 2020, 8 (1): 48.
- [40] Liao S L, Wang Y Y, Liu H, et al. Deciphering the microbial taxonomy and functionality of two diverse mangrove ecosystems and their potential abilities to produce bioactive compounds[J]. *mSystems*, 2020, 5(5): e00851-19.
- [41] Metzker M L. Sequencing technologies—The next generation[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11 (1): 31—46.
- [42] Midha M K, Wu M C, Chiu K P. Long-read sequencing in deciphering human genetics to a greater depth[J]. *Human Genetics*, 2019, 138 (11/12): 1201—1215.

(责任编辑：卢 萍)