

文章编号: 1000-5641(2023)03-0118-14

潮滩湿地硝化螺菌的代谢潜力和环境适应机制

陈国浩, 毛铁墙, 董宏坡, 欧亚飞, 张家伟

(华东师范大学 河口海岸学国家重点实验室, 上海 200241)

摘要: 为了揭示硝化螺菌 (*Nitrospira*) 在潮滩湿地中的代谢潜力和环境适应机制, 本研究使用宏基因组学拼接与组装的方法, 从中国沿岸的 5 个潮滩湿地构建了 14 个较高质量的 *Nitrospira* 基因组. 系统发育分析结果表明, 在这些基因组中, 3 个属于全程氨氧化细菌 (complete ammonia oxidizer, Comammox); 9 个为硝化螺菌世系 II 和 IV; 2 个属于至今未见报道的世系 III 型. 这表明, 潮滩湿地富含多样化的硝化螺菌类群. 代谢分析表明, 潮滩湿地 Comammox 和典型的 *Nitrospira* 含有氰酸酶、脲酶以及参与腈类、酰胺类化合物分解的酶, 暗示着它们能够与氨氧化微生物耦合利用有机氮作为能源. 此外, *Nitrospira* 有着多重压力抵抗、病毒防御和渗透压调控策略. 这些结果深化了对 *Nitrospira* 在潮滩湿地的多样性、生态功能潜力和环境适应机制上的认识.

关键词: 硝化螺菌; 系统发育; 代谢潜力; 环境适应; 潮滩湿地

中图分类号: Q938.1 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1000-5641.2023.03.012

Metabolic potential and environmental adaptation mechanisms of *Nitrospira* in tidal flat wetlands

CHEN Guohao, MAO Tieqiang, DONG Hongpo, OU Yafei, ZHANG Jiawei

(State Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research, East China Normal University,
Shanghai 200241, China)

Abstract: To understand the metabolic potential and environmental adaptation mechanisms of *Nitrospira* in tidal flat wetlands, 14 high-quality *Nitrospira* genomes were constructed from five tidal flat wetlands along the coast of China using metagenomic binning and assembly methods. Phylogenetic analysis showed that among these genomes, three belonged to Comammox (complete ammonia oxidizer), nine belonged to lineage II and IV of *Nitrospira*, and two belonged to lineage III, which has yet to be discovered; taken together, this data suggests that abundant and diverse *Nitrospira* are present in China's tidal flat wetlands. Metabolic reconstruction revealed that these Comammox and *Nitrospira* contained cyanase, urease, and other enzymes involved in the degradation of nitrile compounds and amide compounds; hence, they may utilize the organic nitrogen as energy by coupling with ammonia-oxidizing microorganisms. In addition, *Nitrospira* possessed flexible strategies to resist environmental stresses such as viral attack and osmotic changes. These results provide insights on the diversity, ecological function, and environmental adaptation mechanisms of *Nitrospira* from tidal wetlands.

Keywords: *Nitrospira*; phylogeny; metabolic potential; environmental adaptation; tidal flat wetland

收稿日期: 2021-07-26

基金项目: 国家自然科学基金 (41971125, 42030411)

通信作者: 董宏坡, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为海洋微生物生态学. E-mail: hpdong@sklec.ecnu.edu.cn

0 引言

硝化过程是氮素转化的重要环节, 包括氨氧化作用和亚硝酸盐氧化作用, 主要是由微生物主导^[1-2]. 氨氧化古菌 (ammonia-oxidizing archaea, AOA) 和氨氧化细菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 主要负责将氨氧化为亚硝酸盐^[3-4], 而亚硝酸盐氧化细菌 (nitrite-oxidizing bacteria, NOB) 主要负责将亚硝酸盐氧化为硝酸盐^[5]. 尽管最近发现了能够直接将氨氧化为硝酸盐的细菌^[6], 即全程氨氧化细菌 (complete ammonia oxidizer, Comammox), 但至今仍未在海洋环境中发现 Comammox 的基因组序列^[7], 故 NOB 对于亚硝酸盐的氧化仍为硝酸盐的主要来源之一^[8-9].

硝化螺菌 (*Nitrospira*) 是 NOB 中多样性最为丰富的属, 至今已发现至少有 6 个世系 (lineages)^[10], 然而, 仅 5 个 lineages 的亚硝酸盐氧化还原酶 (nitrite oxidoreductase, NXR) 基因序列^[11] 和 3 个 lineages 的基因组被揭示. 特别地, lineage III 的培养代表和基因组至今未被发现, 这意味着 *Nitrospira* 仍然存在较多未知的类群. 其中, Comammox 在进化上属于 *Nitrospira* lineage II, 是近年来氮循环中的一个重大发现, 该细菌可以独立地完成两步硝化过程^[6]. *Nitrospira* 广泛分布在土壤、淡水、热泉、地下水、人工系统和海洋中^[10-12]. 根据调查和生理实验, *Nitrospira* 的分布和多样性受到盐度、温度和底物浓度等因素的影响^[13-15].

近年来, 发现 *Nitrospira* 不仅存在全球分布的特征, 还有着多样的代谢功能和生存方式. 有的 *Nitrospira* 编码着脲酶和氰酸酶基因^[16-17], 能将这些有机氮素降解为氨, 为氨氧化微生物提供能源. 特别地, 部分 Comammox *Nitrospira* 能直接利用尿素和氰酸盐作为能源^[6,18-19], 拓宽了对 *Nitrospira* 利用氮素的认识. 另外, *Nitrospira* 还可利用氢气、甲酸盐和硫化物作为电子供体驱动生长^[16,19-20]. 这些功能潜力对氮循环和 *Nitrospira* 自身生长均至关重要. 然而, 目前从潮滩湿地获得的 *Nitrospira* 基因组及培养样品较为缺乏, 对其在潮滩湿地中的功能认识非常有限. 因此, 利用一些新技术获取更多基因组对 *Nitrospira* 进行研究很必要.

潮滩湿地是陆地和海洋的交界地带, 其在全球的生物地球化学循环中发挥着重要作用. 大量富含氮的生活污水和农业肥料通过径流作用在潮滩湿地富集, 经过一系列的转化作用后, 部分流入海洋. 根据已有的报道, *Nitrospira* 在人工污水处理系统中发挥着关键的作用, 具有较高的功能多样性^[18-19,21]. 天然的潮滩湿地, 包括红树林湿地、盐沼湿地和河口等, 是庞大而重要的污水处理系统, 含有丰富多样的 *Nitrospira* 物种^[22-25]. 为了进一步认识 *Nitrospira* 在潮滩湿地中的功能, 本研究选取了中国沿海 5 个跨不同纬度的潮滩湿地, 从沉积物样品中恢复了 14 个 *Nitrospira* 基因组. 通过对系统发育、代谢通路和环境适应等方面的分析, 深入研究了这些基因组, 以期理解 *Nitrospira* 在潮滩湿地中的重要生态功能提供更多的科学依据.

1 材料与方法

1.1 研究站位和采样

本研究从中国沿海的 3 个潮滩湿地获得 12 个沉积物样品, 包括辽河口盐沼湿地 (LH01 和 LH02)、崇明岛东滩湿地 (CM01 和 CM02)、三亚青梅港红树林自然保护区 (QM). 使用重力柱采集器, 在崇明岛东滩湿地和三亚青梅港红树林自然保护区获得 3 个 1 m 深的沉积物柱, 且每个沉积柱样品被平均分割成 3 ~ 4 份; 在辽河口盐沼湿地获得两个表层 (0 ~ 5 cm) 沉积物样品 (LH01 和 LH02). 所有样品采集完后立即装进密封的无菌样品盒, 并放入装有干冰的储物箱中运送至实验室, 将样品储藏在 -80℃ 冰箱中用于测序和理化分析. 另外, 两个潮滩湿地的宏基因组样品数据 (表 1) 从开放的公共数据库美国国家生物技术信息中心 (the national center for biotechnology information, NCBI, <https://>

www.ncbi.nlm.nih.gov) 中获得.

1.2 DNA 提取和测序

使用 DNA 提取试剂盒 (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA), 从 5 ~ 10 g 沉积物中提取基因组 DNA, 使用 Qubit 2.0 和 Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 检测 DNA 提取质量. 检测合格的 DNA 样品被用于文库构建和测序. 宏基因组测序数据由 Illumina HiSeq 2500 仪器生成, 每个样品大约获得 60 G 双端原始测序序列数据.

1.3 宏基因组组装和基因组重构

本研究共获得 15 个宏基因组数据 (表 1), 包括从 NCBI 下载的 3 个数据 (YD、ZN01 和 ZN02), 其中, YD 由 2 个较小的宏基因组混合组成. 宏基因组拼接与分箱步骤包括: 先使用 Trimmomatic 软件^[26]对原始序列进行质量裁剪, 再使用 MEGAHIT 软件^[27]进行组装, 参数为 (--k-min 27, --k-max 127, --k-step 10), 然后将拼接得到的序列使用 MetaBAT 软件^[28]进行分箱, 最后使用 CheckM 软件^[29]将分箱得到的基因组进行完整度和污染度的质量分析. 多样的基因组组装参数通过 QUAST^[30]进行评估. 基因组的分类使用 GTDB-TK 工具^[31]获得, 仅属于 Nitrospirae 门的基因组被关注. 序列分类通过 CAT 软件 (<https://github.com/dutilh/CAT/releases/tag/v5.2.3>) 识别, 分类成其他门的序列被移除; 同时, 不一致的序列被 CheckM 软件^[29]基于单拷贝基因进行识别和手动移除. 最后, 对候选的基因组基于 GC (guanine and cytosine) 含量、覆盖度和四核苷酸频率使用 RefineM^[32]进行检查和校正, 完整度大于 70% 和污染度小于 5% 的基因组会被进一步分析.

表 1 样品的物理和化学性质

Tab. 1 Physical and chemical properties of the samples

样品	站位	位置	深度/cm	盐度/‰	温度/℃	pH 值	采样时间	来源
CM01s	CM01	31°30'N, 121°58'E	15~20	0.9	9.3	8.16	2018年11月	崇明东滩湿地 (上海市)
CM01m	CM01	31°30'N, 121°58'E	55~60	1.0	9.3	8.10	2018年11月	崇明东滩湿地 (上海市)
CM01b	CM01	31°30'N, 121°58'E	95~100	1.1	9.3	8.22	2018年11月	崇明东滩湿地 (上海市)
CM02s	CM02	31°30'N, 121°58'E	15~20	1.2	9.2	7.99	2018年11月	崇明东滩湿地 (上海市)
CM02m	CM02	31°30'N, 121°58'E	55~60	0.9	9.2	8.36	2018年11月	崇明东滩湿地 (上海市)
CM02b	CM02	31°30'N, 121°58'E	95~100	0.9	9.2	8.37	2018年11月	崇明东滩湿地 (上海市)
QMs	QM	18°13'N, 109°37'E	0~5	9.0	23.5	7.17	2020年11月	青梅港红树林自然保护区 (海南省, 三亚)
QMm	QM	18°13'N, 109°37'E	10~15	11.0	23.5	7.43	2020年11月	青梅港红树林自然保护区 (海南省, 三亚)
QMb	QM	18°13'N, 109°37'E	25~30	12.0	23.5	7.54	2020年11月	青梅港红树林自然保护区 (海南省, 三亚)
LH01	LH01	40°47'N, 121°56'E	0~5	27.0	14.3	8.15	2019年03月	辽河口盐沼湿地 (辽宁省)
LH02	LH02	40°51'N, 121°56'E	0~5	26.0	12.0	7.93	2019年03月	辽河口盐沼湿地 (辽宁省)
ZN01	ZN01	24°20'N, 117°45'E					2015年09月	紫泥红树林自然保护区 (福建省, 龙海) ^[33]
ZN02	ZN02	24°20'N, 117°45'E					2015年09月	紫泥红树林自然保护区 (福建省, 龙海) ^[33]
YD	YD	37°49'N, 119°07'E					2017年12月	黄河三角洲湿地 (山东省)

注: ZN01、ZN02 和 YD 从 NCBI 公共数据库中获得, SRA ID 分别为 ZN01 (ERR2179510)、ZN02 (ERR2179512)、YD (SRR9656206, SRR9656207). 其中, YD 由两个较小宏基因组混合组成, 其余样品数据均从本研究中获得.

1.4 系统发育分析和基因组注释

为确定重构基因组的系统发育地位,本研究从NCBI数据库下载了Nitrospirae门的基因组. 通过使用GTDB-TK软件^[31]对细菌的120个标记蛋白进行串联,并使用IQ-TREE软件^[34]构建最大似然树,利用iTOL^[35]对进化树进行可视化. 为进一步识别基因组的进化地位,使用Barrnap软件(<https://github.com/tseemann/barrnap>)预测基因组的16S rRNA基因. 同时,从NCBI数据库中下载了其他的16S rRNA基因,使用MAFFT软件^[36]对这些序列进行比对,并使用BMGE软件^[37]进行切边处理. 最后,使用IQ-TREE软件^[34]构建最大似然树和利用iTOL^[35]对进化树进行可视化.

为探究氰酸酯酶基因的进化地位,从NCBI中下载已知的NOB和AOA的氰酸酯酶基因的氨基酸序列及相似的部分序列,并利用HMMER3^[38]识别公共数据库及本研究获得的*Nitrospira*属基因组中的氰酸酯酶基因. 比对所有这些氨基酸序列,对所得结果使用IQ-TREE软件^[35]进行最大似然树的构建.

使用Prodigal软件^[39]对基因组的开放阅读框(open reading frame, ORF)进行预测,并将核酸序列翻译为蛋白序列. 然后,使用BlastP工具^[40]比对COG和NCBI非冗余蛋白数据库,进行蛋白功能的注释(E -value 阈值 $< 1 \times 10^{-5}$). 同时,通过在线的KASS^[41]工具进行注释.

2 结果与讨论

2.1 *Nitrospira* 基因组的恢复

从5个跨越温带和热带的潮滩湿地沉积物中,使用宏基因组测序的方法拼接与组装得到14个较高质量(完整度 $>70\%$ 、污染度 $<5\%$)的*Nitrospira*基因组(metagenome-assembled genomes, MAGs)(表2). 依据大于95%的种间平均核酸相似度(average nucleotide identity, ANI)阈值^[42],这些MAGs可被划分为10个新物种. 同时,基因组系统发育树(图1)显示,这些MAGs位于3个不同lineages中,包括lineage II、lineage IV和一个未被定义的系统发育分支. 其中,3个MAGs与clade A comammox *Nitrospira*聚在一起. 依据已有的研究, lineages II和lineage IV分别来自两个完全不同的生态环境系统,分别为陆地和海洋^[10],这意味着潮滩湿地的*Nitrospira*有更高的物种多样性. 有趣的是,基因组进化树显示,QMm6和QMb135这两个*Nitrospira*物种形成独立的一簇(图1),且不属于任何已知的世系,可能为新的*Nitrospira*物种.

为了进一步揭示由QMm6和QMb135聚类成的这一未知的系统发育分支,基于*Nitrospira* 16S rRNA基因构建系统发育树(图2). 本研究发现16S rRNA基因树与*Nitrospira*基因组树有着近乎一致的拓扑结构,且QMm6和QMb135这两个未曾被揭示的基因组所含的16S rRNA基因序列与前人报道的lineage III中的16S rRNA序列聚类成一簇,这意味着这两个MAGs隶属于此前被划分的lineage III^[12]. 这一独特的lineage从发现至今已超过20年,但只有相应的16S rRNA基因被揭示,而该分支的培养样品和基因组均未被获得^[11-12],因此,其生理功能和代谢潜力仍有着很大的未知. 本研究首次发现的这两个隶属于lineage III的MAGs有着较高的恢复质量(完整度分别为95.91%和96.82%),在中国三亚青梅港红树林沉积物中获得. 同时,对16S rRNA序列的分析发现,该lineage的成员分布在深海沉积物^[43-44]、陆地喀斯特岩洞^[45-46]和盐碱土环境中(图2). 而本研究在红树林沉积物中首次发现了lineage III,扩大了它们的生境分布范围.

2.2 代谢潜力分析

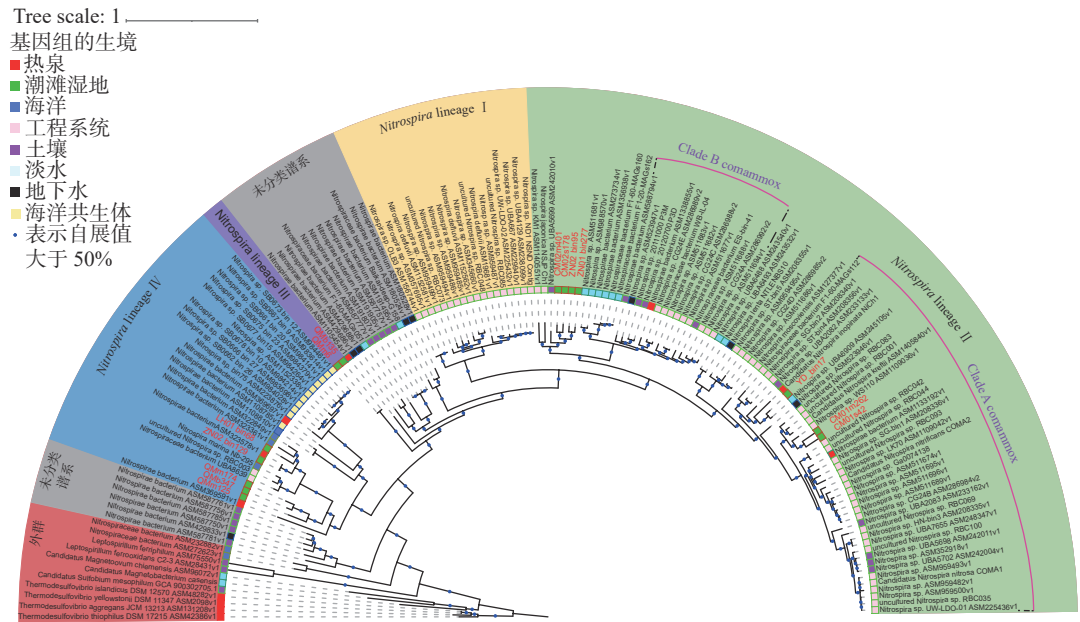
本研究重构了14个*Nitrospira* MAGs的代谢途径(图3),结果表明,这些MAGs有着典型的*Nitrospira*所具备的中心碳代谢和能量传递系统,如还原型三羧酸循环、糖酵解/糖质新生及磷酸戊糖途径等. 尽管少部分MAGs缺失亚硝酸盐氧化还原酶alpha亚基和亚硝酸盐氧化还原酶beta亚基,但有多拷贝的亚硝酸盐氧化还原酶gamma亚基存在于这些基因组中. 在3个Comammox的基因组

中, 仅 CM01m262 含有氨单加氧酶 gamma 亚基和 CM01s42 含有羟胺氧化还原酶 (hydroxylamine oxidoreductase, HAO), 但它们均含有区别于严格亚硝酸盐氧化 *Nitrospira* 的 Rh 类型氨转运体^[18,47], 意味着这 3 个 MAGs 为典型的 Comammox *Nitrospira*. 这些 MAGs 除具有进行亚硝酸盐氧化或全程氨氧化的作用外, 还具有更多的代谢潜力.

表 2 从潮滩湿地宏基因组组装中提取的 14 个硝化螺旋菌的基因组特征

Tab. 2 Genomic features of 14 *Nitrospira* MAGs recovered from metagenomic assembly in tidal flat wetlands

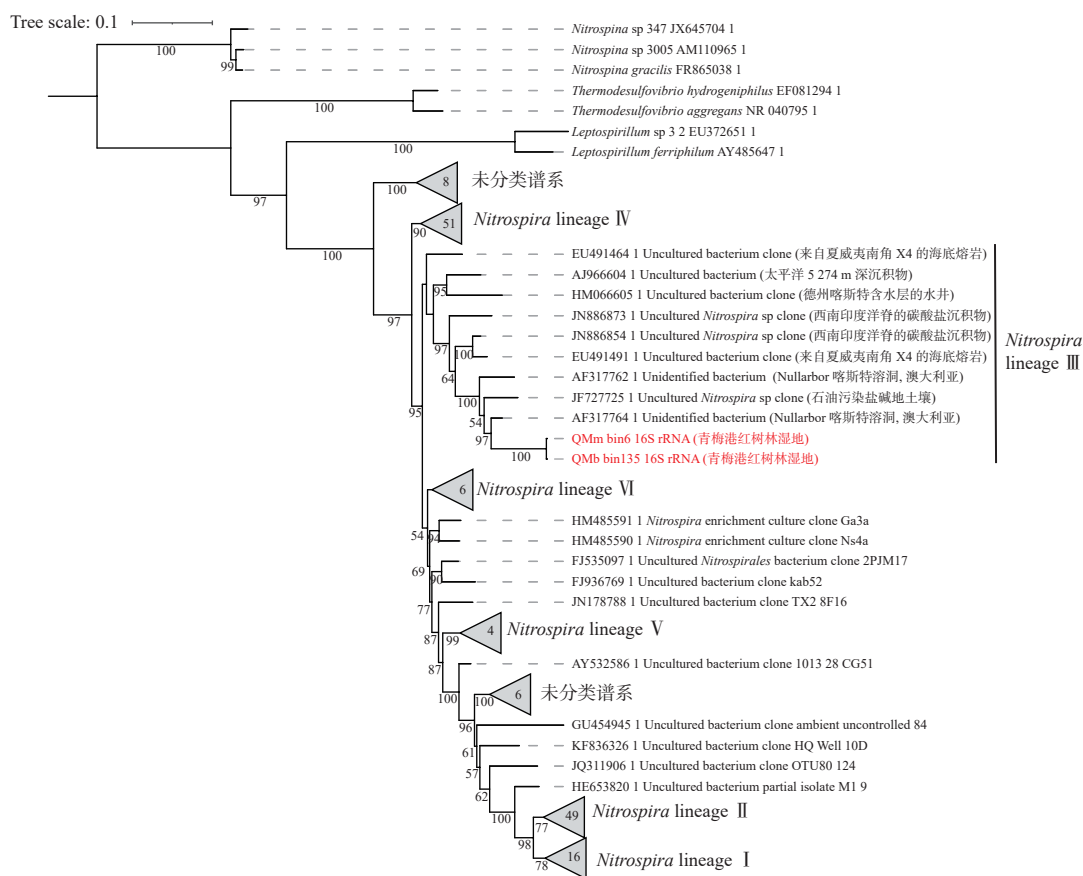
基因组名称	序列数	基因组大小/Mb	GC含量/%	编码基因数	完整度/%	污染度/%
QMm6	86	3.34	64.94	3 169	93.18	2.27
QMm125	437	3.29	51.51	3 459	93.53	0
QMm174	409	3.16	49.78	3 228	76.53	0.91
QMb135	78	3.30	64.94	3 087	96.82	2.27
QMb347	295	4.20	50.36	4 065	95.85	0.30
ZN01_bin277	601	3.64	55.70	3 993	95.40	2.16
ZN02_bin95	568	3.66	55.78	4 023	97.37	4.99
ZN02_bin129	407	3.49	49.77	3 557	92.85	2.12
CM01m262	247	4.30	55.30	4 495	77.04	0.91
CM01s42	677	3.05	55.63	3 529	71.65	0.81
CM02s178	624	3.69	56.05	4 084	80.30	1.75
CM02m401	591	3.47	55.53	3 875	86.30	0.91
YD_bin17	653	2.16	57.60	2 620	72.60	0.36
LH01_bin68	697	3.33	47.95	3 659	81.20	2.73



注: 红色字体为本研究获得的基因组, 用不同颜色的正方形框表示基因组的生境来源.

图 1 基于 120 个保守串联蛋白构建的 *Nitrospira* 基因组最大似然树

Fig. 1 *Nitrospira* genomic maximum likelihood tree based on 120 conserved proteins



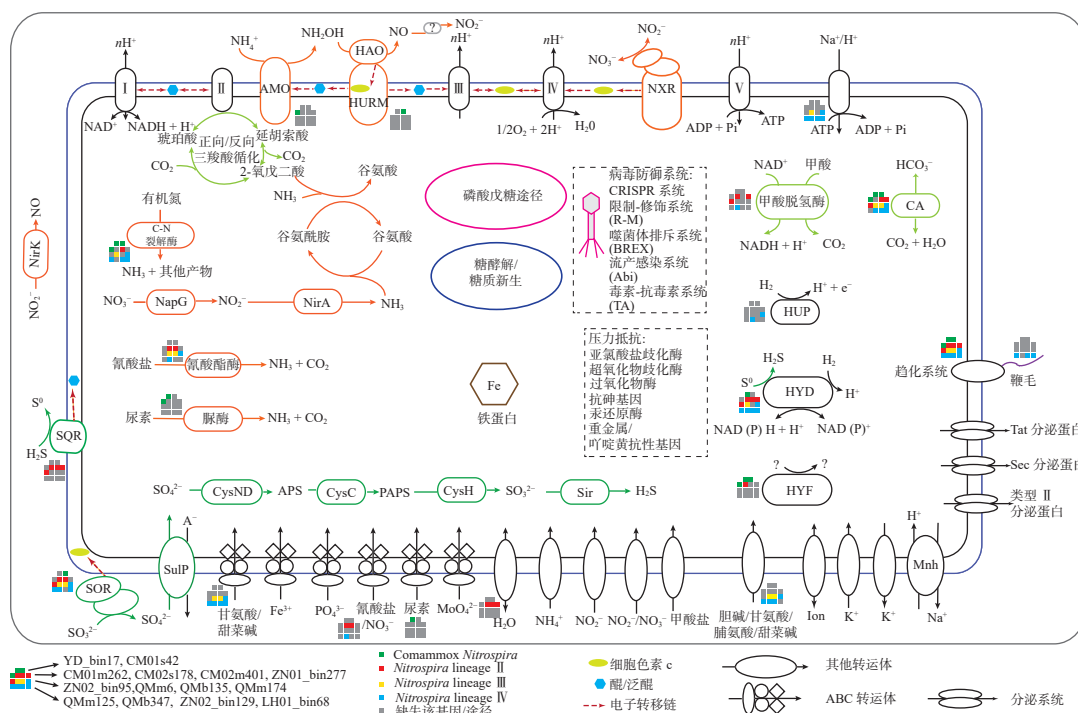
注: 该最大似然树通过使用 1 000 次重复计算自举值, 在分支节点处只显示超过 50% 的自举值, 本研究的序列使用红色字体表示, 比例尺表示核苷酸取代百分比.

图 2 基于 *Nitrospira* 16S rRNA 序列构建的最大似然树

Fig. 2 Maximum likelihood tree based on *Nitrospira* 16S rRNA sequences

近年来, 研究者们发现 *Nitrospira* 可将尿素或氰酸盐降解为铵盐, 通过“互喂作用”为氨氧化微生物和 Comammox 提供底物^[16-18,48]. 尿素的裂解已经在一些富集培养的 Comammox 菌株 (*Ca. Nitrospira nitrosa*, *Ca. Nitrospira nitrificans* 和 *Ca. Nitrospira inopinata*) 中被观察到^[6,47]. 在本研究中, 脲酶基因在两个 Comammox MAGs (CM01m262 和 YD_bin17) 中被识别 (图 3), 其中 YD_bin17 含有部分相应的 ABC 转运系统, 这意味着尿素也可以被这些来自潮滩湿地的 Comammox 所利用. 这些 Comammox 主要存在于盐度较低的 CM01 和 YD 站位中. 最近的研究表明, 有机肥的使用和工厂产生了大量的尿素, 这些尿素通过径流进入水生生态系统中, 并在河口湿地中积累^[45], 导致河口湿地富营养化^[49] 和水体缺氧^[50], 而本文获得的这些 Comammox 可以直接转化尿素并减缓尿素的积累. 尽管尿素的利用已经在一些富集培养的典型 *Nitrospira* 中被观察到^[16,51], 然而, 本研究获得的所有 11 个典型的 *Nitrospira* 基因组均没有包含脲酶基因, 这意味着典型的 *Nitrospira* 与氨氧化微生物通过降解尿素进行互惠生长的过程在潮滩湿地中可能并不普遍. 研究表明, 尿素可自发地裂解为氰酸盐, 广泛存在于环境中并参与氮循环^[52-53]. 本研究获得的 6 个 *Nitrospira* MAGs 中含有氰酸酯酶基因 (图 3), 其中 3 个来自 CM02 和 QM 站位的 *Nitrospira* MAGs 编码着相应的氰酸盐转运体, 表明这些 *Nitrospira* 可分解潮滩湿地环境中的氰酸盐为铵盐, 并为硝化微生物提供能源, 对氮素循环发挥着重要的作用. 本研究中的 3 个 Comammox MAGs 均不含有氰酸酯酶基因, 这些基因仅在污水处理系统的几个 Comammox *Nitrospira* 成员中被发现^[18-19]. 令人意外的是, 从 lineage III 两个基因组中发现的氰酸酯酶

与此前在其他 *Nitrospira* 成员中发现的有着不同的进化关系 (图 4(a)), 它们之间有着较低的氨基酸相似度 (<40%); 前人发现的 *Nitrospira* 中的氰酸酯酶与 AOA 菌株 *Nitrososphaera gargensis* 的氰酸酯酶有着更近的发育关系 (图 4(b)), 而本研究获得的这些序列与 Nitrospinae 门和厌氧氨氧化细菌 (anaerobic ammonium oxidation, anammox) 的氰酸酯酶有着更近的进化关系 (图 4(c)). 在 AOA 菌株 *Nitrososphaera gargensis* 中, 氰酸酯酶可分解氰酸盐产生氨作为单一能源^[17]; 而海洋中的 anammox 和 *Nitrospira* 细菌也表现出降解氰酸盐的潜力, 可以使用氰酸盐作为氮源, 或基于对氨氧化微生物的“互喂”机制作为间接能源^[54-56]. 在潮滩湿地 MAGs 中发现的这些氰酸酯酶氨基酸序列均含有保守的 Arg96、Glu99、Ser122 活性位点残基^[57] (图 5), 这意味着 *Nitrospira* 成员中发现的这两种有着不同亲缘关系的氰酸酯酶均具有裂解氰酸盐的潜力. 这些新发育分支的氰酸酯酶氨基酸序列与 *Nitrospira* sp.(MBM14886.1) 有着较高的氨基酸相似度 (75% ~ 82%), 意味着它们之间可能发生了水平基因转移事件. 在 *Nitrospira* 中新的氰酸酯酶进化分支的这一发现, 拓展了研究人员对 *Nitrospira* 成员中氰酸酯酶的认知, 表明该酶在 *Nitrospira* 中的分布可能更为多样化. 这两个进化分支的氰酸酯酶基因广泛存在于 *Nitrospira* 不同的 lineage 基因组中, 而这些不同 lineage 的 *Nitrospira* 广泛分布于全球的各种生态系统, 包括开阔大洋和陆地生态系统, 意味着氰酸盐在全球广泛被 *Nitrospira* 作为有机氮降解的底物, 并为氨氧化微生物提供能源.



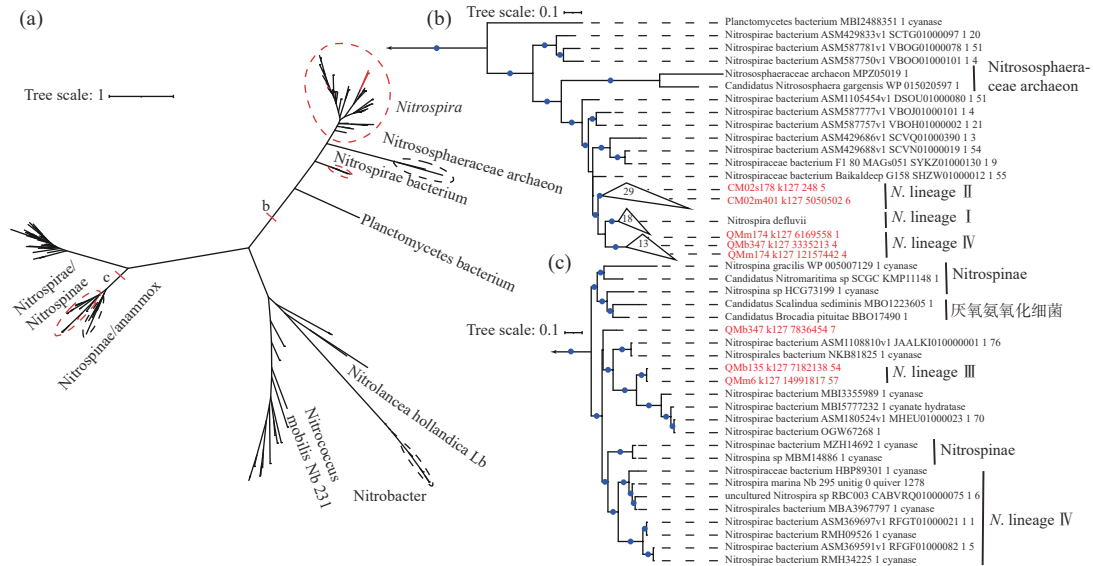
注: 所有 14 个 MAGs 被分为 4 个不同的 *Nitrospira* 类群, 包括 Comammox *Nitrospira*, 典型的 *Nitrospira* lineage II、lineage III 和 lineage IV, 并使用不同颜色的正方框进行标记. 使用不同颜色标记一些类群存在的差异, 而缺失该代谢途径的基因组使用浅灰色标记.

图 3 重构 14 个 *Nitrospira* 基因组的代谢途径

Fig. 3 Metabolic pathways of 14 *Nitrospira* MAGs

特别地, 这些 *Nitrospira* MAGs 可能在参与有机氮转化方面具有更大的功能潜力. 本研究中获得 9 个 *Nitrospira* MAGs 中注释有“nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase”或“carbon-nitrogen hydrolase family protein”, 它们属于氮-碳裂解酶或腈水解酶超家族蛋白, 所有这些蛋白质似乎都参与了有机氮化合物的还原和氨的产生^[58-59] (图 3). 另外, 本文还注意到多个站位的

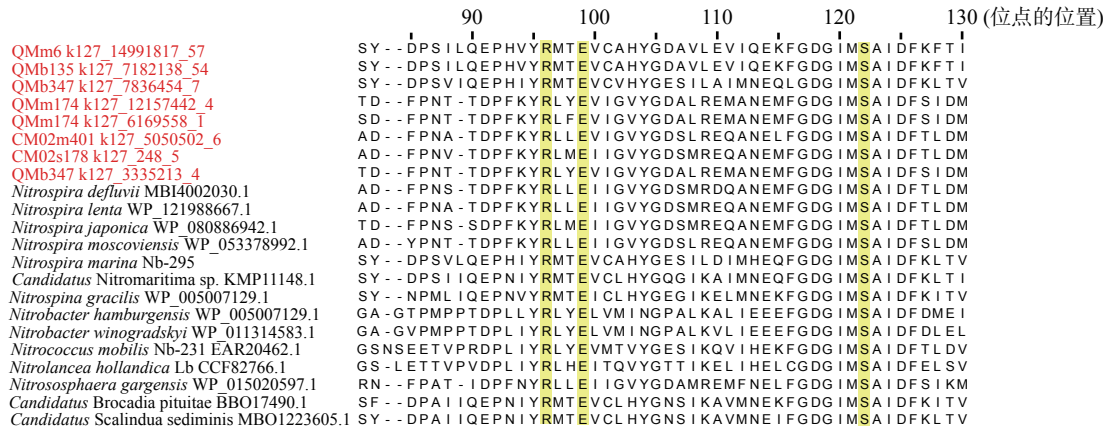
Nitrospira MAGs 含有将一些氨基化合物降解产生氨的酶, 包括烟酰胺酶、酰胺酶和胺氧化酶, 这意味着 *Nitrospira* 可能有更多未被揭示的与氨氧化微生物耦合生长的机制, 这些酶可能对潮滩湿地有机氮的去除发挥着关键的作用。



注: (a) 无根的氨基酸酶最大似然树, 其中来自典型的 NOB 和 AOA 氧化酶的世系被虚线和文字标记; (b) 该分支包含 *Nitrospira* 世系和 AOA 菌株的氨基酸酶; (c) 该分支包括 *Nitrospira* 门和 *Nitrospinae* 门的氨基酸酶。在分支节点处只显示超过 50% 的自举值, 并使用蓝色小圆点进行标记, 红色字体表示本研究获得的氨基酸酶序列。

图 4 氨基酸酶氨基酸序列的系统发育分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of cyanase amino acid sequences



注: 黄色底纹表示氨基酸酶保守的活性位点, 红色字体表示本研究获得的氨基酸酶氨基酸序列。

图 5 氨基酸酶氨基酸位点的比对

Fig. 5 Alignment of cyanase amino acid sites

在本研究中, *Nitrospira* MAGs 含有多种潜在的替代能源, 暗示着 *Nitrospira* 在潮滩湿地环境中更有广泛的生存策略。甲酸已被发现作为一些 *Nitrospira* lineage I、II 和 VI 菌株的电子供体和碳源^[16,21,60]。仅 4 个来自 CM01、ZN02 和 QM 站点的 *Nitrospira* MAGs 含有甲酸脱氢酶, 意味着这些 *Nitrospira* 可能有着利用甲酸盐作为生长能源的潜力。尽管 *Nitrospira* MAGs 被识别出含有多种有机物利用途径,

但大多数有机物被验证并不能维持 *Nitrospira* 的持续生长^[15,61-62]。有研究表明, *Nitrospira* 在混合营养中能更好地生长^[12,60-61], 意味着其可能利用部分有机物作为碳源, 这些过程可能对潮滩湿地中有机物的去除有着重要作用。10 个 *Nitrospira* MAGs 含有周质的亚硫酸盐脱氢酶 (sulfite oxidoreductase, SOR) 和 4 个 lineage II MAGs 含有硫化氢氧化还原酶 (sulfide/quinone oxidoreductase, SQR) (图 3), 这两种酶可催化亚硫酸盐 (SO_3^-) 或硫化氢 (H_2S) 的氧化, 并产生电子^[63-65]; 尽管这两种酶也存在于 *Nitrococcus* 和 *Nitrotoga* 中^[66-67], 但仍缺乏相关的生理实验证实 NOB 能够利用这两种酶催化相应硫化物作为生长能源。另外, *Nitrospira* MAGs 含有不同类型的氢气氧化酶, 其中 11 个 MAGs 编码着 Group 3b 镍铁硫还原氢化酶 (group 3b [Ni-Fe] sulfur-reducing hydrogenase, HYD), 该酶能将氢气氧化并产生 NADPH, 同时能消耗 NADPH 将硫还原^[55,66-68]。3 个 Comammox MAGs 和来自 CM02 站位的 CM02s178 (图 3) 中含有假定的 Group 4 氢化酶 (putative group 4 hydrogenase, HYF)。但该酶的大亚基缺失两对在镍铁类型氢化酶中均存在的镍铁中心的半胱氨酸配体^[69], 这一特征在其他典型 *Nitrospira* 中也被揭示^[16,70], 暗示着该酶发挥着未知的功能。来自 QM 站位的 QMb347 和 QMm174 中含有 Group 2a 镍铁氢化酶 (group 2a [Ni-Fe] hydrogenase, HUP), 该酶在 *Nitrospira moscoviensis* 菌株中被证实能够催化氢气氧化, 从而获得能量用于碳的固定和生长^[16]。

2.3 *Nitrospira* 在潮滩湿地环境的适应

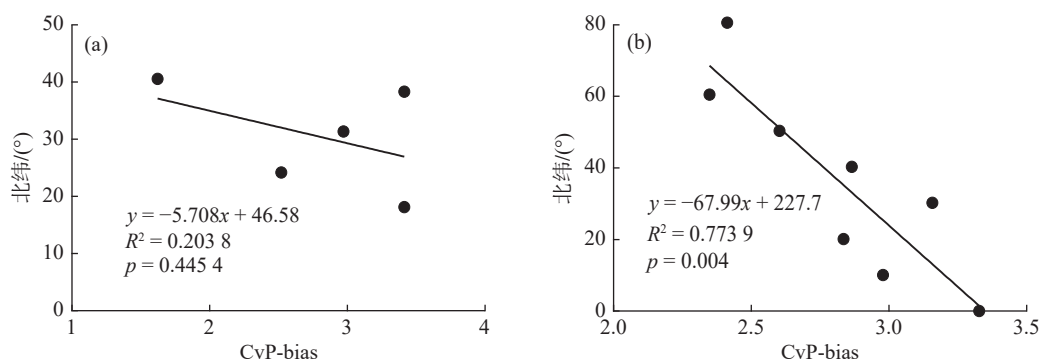
许多研究表明, 潮滩湿地是重金属和污染物积累的区域^[71-73], 并且有着较大范围的盐度和底物浓度的变化^[74]。本研究获得的 *Nitrospira* 基因组编码着次氯酸盐歧化酶、砷酸盐还原酶和汞还原酶, 这或许能消除细胞对来自潮滩中的毒性^[75-77]。我们还发现, 这些基因组编码着超氧化物歧化酶和过氧化物酶, 这些酶能抵抗高浓度的活性氧 (reactive oxygen species, ROS)^[78]。大部分的 *Nitrospira* 还编码着碳酸酐酶 (carbonic anhydrase, CA), 可以将进入细胞的 HCO_3^- 转化为 CO_2 ^[79], 为还原型的三羧酸循环提供碳源。根据报道, 大部分培养的 *Nitrospira* 含有鞭毛^[51], 而我们获得的 14 个基因组中仅 QM、ZN02 和 LH01 站位中的 3 个编码着较完整的鞭毛系统, 这意味着潮滩湿地中的 *Nitrospira* 可能有着独立的生态位。

由于潮滩湿地有着较大的盐度差, 故 *Nitrospira* 可能需要有特殊的代谢途径来适应盐度变化较大的潮滩环境。有研究表明, *Nitrospira* 编码着调节渗透压的重要物质转运通道, 包括水通道 (aquaporin Z, AqpZ)、机械离子感应通道 (mechanosensitive ion channel, MSC) 和甜菜碱 ABC 转运蛋白等^[80-82]。值得注意的是, 本研究获得的 MAGs 中, 仅隶属于 lineage IV 和 lineage III 的 MAGs 编码有 H^+/Na^+ 逆向转运体和甘氨酸/甜菜碱 ABC 转运体, 这些基因组主要来自盐度更高 (9‰ ~ 27‰) 的 QM 和 LH 站位。水通道蛋白仅在隶属于 lineage II 的 3 个 MAGs 中被发现 (图 3), 这些基因组来自盐度更低 (<5‰) 的 CM02 和 ZN01 站位。有研究表明, 许多生活在低营养海洋环境中的细菌通常存在一些有机渗透物 (甜菜碱、脯氨酸和甘露糖醇等) 的 ABC 转运体^[83], 使得这些细菌能够更好地适应高盐度的海洋环境^[84]。这意味着在潮滩湿地中, 不同盐度站位的 *Nitrospira* 成员有着不同的渗透压调控机制, 高盐度站位的 *Nitrospira* 可通过编码有机渗透物的 ATP 转运体来适应高盐度的胁迫。

令人惊讶的是, 本研究获得的这些 *Nitrospira* MAGs 的抗病毒系统有着较高的多样性 (图 3), 大部分 MAGs 编码 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 相关蛋白。然而, 由于一个完整的 CRISPR 防御系统至少含有一个核心的 *cas* 基因^[85], 而本研究获得的 MAGs 中仅 QMb347 和 QMb135 含有核心的 *cas* 基因, 故而暗示着其他 MAGs 可能不能利用 CRISPR 系统进行病毒的防御。但有研究表明, 细菌的限制-修饰 (restriction-modification, R-M) 病毒免疫系统广泛存在于原核生物中, 能攻击进入细胞的外来 DNA^[86]。本研究获得的 *Nitrospira* MAGs 中注释有 Type I-III R-M 系统的关键基因 (Restriction endonuclease 和 DNA methylase), 意味着该免疫系统可能在这些

Nitrospira MAGs 中发挥着重要的病毒防御作用. 此外, 毒素抗毒素系统 (toxin-antitoxin, TA) 和流产感染系统 (abortive infection system, Abi) 的相关基因也普遍存在于这些 MAGs 中, 这两种免疫系统均采用自杀方式进行病毒的抵抗^[87-88]. 另外, QMm125 基因组中包含噬菌体排斥系统 (bacteriophage exclusion, BREX) 的大部分基因, 也可能发挥着相应的病毒防御功能^[89]. 尽管噬菌体让大量细菌感染致死并影响着微生物群落结构, 但同时也是驱动基因进化和生物遗传多样性的重要动力^[90]. 特别地, *Nitrospira* MAGs 中发现含有大量噬菌体组装和侵染相关基因, 这表明噬菌体介导的水平基因转移 (horizontal gene transfer, HGT) 可能广泛发生在 *Nitrospira* 群体中^[91-92], 并推动 *Nitrospira* 基因组趋于多样化和适应全球广泛的生态环境.

本研究中从潮滩湿地恢复的 *Nitrospira* MAGs 分布在较宽的纬度范围 (18.22°N ~ 40.78°N), 这些长期栖息在不同纬度位置的 *Nitrospira* 可能受到不同温度的胁迫. 研究表明, 极端嗜热蛋白需要更多的带正电荷的残基及通过牺牲极性氨基酸残基来保持蛋白质的稳定性^[93]. 因此, 带电氨基酸和极性氨基酸的百分比差异 (difference between the proportions of charged versus polar (non-charged) amino acids, CvP-bias) 常被用来研究微生物的热适应能力^[94-95]. 我们计算了 14 个 *Nitrospira* 基因组的 CvP-bias 值, 将每个站位基因组的 CvP-bias 平均值与纬度位置进行线性回归. 结果显示, CvP-bias 平均值与纬度之间有一定负相关性, 但并不显著 ($y = -5.708x + 46.58$, $R^2 = 0.2038$, $p = 0.4454$; 图 6(a)). 最小和最大的平均基因组 CvP-bias 值分别对应最高纬度和最低纬度. 这意味着, 在有更高温度的较低纬度位置, *Nitrospira* MAGs 可能有更高的 CvP-bias 值, 即需要使用更多的带电氨基酸以适应更高的温度. 但这一结果并不显著, 这可能与基因组和站位数量有关. 为进一步验证纬度及温度与 *Nitrospira* 基因组 CvP-bias 值关系的显著性, 所有含纬度信息 (1°N ~ 82°N) 的 99 个 *Nitrospira* 基因组的 CvP-bias 值被计算. 为克服不同生境差异带来的偏差, 取每 10° 纬度间的基因组 CvP-bias 值的平均值, 且热泉基因组被假定为赤道样品 (0°), 并与纬度位置进行线性回归. 线性拟合结果显示, 基因组的 CvP-bias 与纬度呈现显著的负相关性 ($y = -67.99x + 227.7$, $R^2 = 0.7739$, $p < 0.005$; 图 6(b)). 这表明, 生活在较低纬度和热环境的 *Nitrospira* 在一定程度上拥有更多带电氨基酸来维持蛋白质的热稳定性, 而在高纬度位置的 *Nitrospira* 普遍有更低的 CvP-bias 值.



注: (a) 本研究获得的 5 个站位 *Nitrospira* 基因组中每个站位的基因组平均 CvP-bias 值与纬度的线性关系; (b) 从数据库中获取的共 99 个含纬度信息的 *Nitrospira* 基因组中每 10° 间的基因组平均 CvP-bias 值与纬度的线性关系.

图 6 纬度与平均 CvP-bias 值的线性关系

Fig. 6 Linear relationship between latitude and CvP-bias

3 结 论

本研究获得了不同纬度位置潮滩湿地的宏基因组样品, 并分析了 14 个从中恢复的 *Nitrospira* MAGs 的系统发育、功能潜力和潮滩环境适应机制. 结果显示, 这些 *Nitrospira* MAGs 有着丰富的物

种多样性和生态功能潜力. 本研究首次获得了两个隶属于 *Nitrospira* lineage III 的基因组, 暗示潮滩湿地含有未被揭示的类群. 代谢通路分析发现, 这些 *Nitrospira* MAGs 有多种可选择能源利用途径、压力防御方式和病毒抵抗机制. Comammox 和典型的 *Nitrospira* 在尿素和氰酸酶的利用上存在明显差异. 此外, 更多含氮有机化合物可能被这些 *Nitrospira* 作为硝化作用的能源, 这对潮滩湿地有机氮素的去除起着重要作用. 同时, 这些 *Nitrospira* 来自不同的纬度位置, 研究表明了它们在不同的站位应对盐度、温度和含氮化合物等展现出不同的适应策略. 这些研究结果加深了对 *Nitrospira* 在代谢潜力和环境适应机制上的认识, 为深入理解潮滩湿地的氮循环过程提供了重要的依据。

[参 考 文 献]

- [1] BEHRENFELD M J, O'MALLEY R, SIEGEL D, et al. Nitrifiers: More than 100 years from isolation to genome sequences [J]. Microbe Magazine, 2006, 1(5): 229-234.
- [2] KUYPERS M M M, MARCHANT H K, KARTAL B. The microbial nitrogen-cycling network [J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(5): 263-276.
- [3] KÖNNEKE M, BERNHARD A, DE LA TORRE J, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon [J]. Nature, 2005, 437(7058): 543-546.
- [4] SOLIMAN M, ELDYASTI A. Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): Opportunities and applications—a review [J]. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2018, 17(2): 285-321.
- [5] WINOGRADSKY S. Contributions a la morphologie des organismes de la nitrification [J]. Archives of Microbiology, 1892(1): 88-137.
- [6] DAIMS H, LEBEDEVA E V, PJEVAC P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria [J]. Nature, 2015, 528(7583): 504-513.
- [7] XIA F, WANG J G, ZHU T, et al. Ubiquity and diversity of complete ammonia oxidizers (Comammox) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(24): 1-14.
- [8] ZAKEM E J, AL-HAJ A, CHURCH M J, et al. Ecological control of nitrite in the upper ocean [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1206.
- [9] SAITO M A, MCILVIN M R, MORAN D M, et al. Abundant nitrite-oxidizing metalloenzymes in the mesopelagic zone of the tropical Pacific Ocean [J]. Nature Geoscience, 2020, 13(5): 355-362.
- [10] DAIMS H, LUCKER S, WAGNER M. A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria [J]. Trends in Microbiology, 2016, 24(9): 699-712.
- [11] PESTER M, MAIXNER F, BERRY D, et al. NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing *Nitrospira* [J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(10): 3055-3071.
- [12] DAIMS H, NIELSEN J L, NIELSEN P H, et al. In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2001, 67(11): 5273-5284.
- [13] ALAWI M, OFF S, KAYA M, et al. Temperature influences the population structure of nitrite-oxidizing bacteria in activated sludge [J]. Environmental Microbiology Reports, 2009, 1(3): 184-190.
- [14] XIA Z, WANG Q, SHE Z, et al. Nitrogen removal pathway and dynamics of microbial community with the increase of salinity in simultaneous nitrification and denitrification process [J]. Science of the Total Environment, 2019, 697: 134047.
- [15] USHIKI N, FUJITANI H, AOI Y, et al. Isolation of *Nitrospira* belonging to sublineage II from a wastewater treatment plant [J]. Microbes & Environments, 2013, 28(3): 346-353.
- [16] KOCH H, LUCKER S, ALBERTSEN M, et al. Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(36): 11371-11376.
- [17] PALATINSZKY M, HERBOLD C, JEHLICH N, et al. Cyanate as an energy source for nitrifiers [J]. Nature, 2015, 524(7563): 105-108.
- [18] SPASOV E, TSUJI J M, HUG L A, et al. High functional diversity among *Nitrospira* populations that dominate rotating biological contactor microbial communities in a municipal wastewater treatment plant [J]. Official Journal of the International Society for Microbial Ecology, 2020, 14(7): 1857-1872.
- [19] YANG Y, DAIMS H, LIU Y, et al. Activity and metabolic versatility of complete ammonia oxidizers in full-scale wastewater treatment systems [J]. mBio, 2020, 11(2): 1-15.
- [20] KOCH H, GALUSHKO A, ALBERTSEN M, et al. Growth of nitrite-oxidizing bacteria by aerobic hydrogen oxidation [J]. Science, 2014, 345(6200): 1052-1054.
- [21] GRUBER-DORNINGER C, PESTER M, KITZINGER K, et al. Functionally relevant diversity of closely related *Nitrospira* in activated sludge [J]. Official Journal of the International Society for Microbial Ecology, 2015, 9(3): 643-655.
- [22] JIANG X T, PENG X, DENG G H, et al. Illumina sequencing of 16S rRNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland [J]. Microbial Ecology, 2013, 66(1): 96-104.
- [23] ZHANG H, ZHENG S, DING J, et al. Spatial variation in bacterial community in natural wetland-river-sea ecosystems [J]. Journal of Basic Microbiology, 2017, 57(6): 536-546.

- [24] LIN X, HETHARUA B, LIN L, et al. Mangrove sediment microbiome: Adaptive microbial assemblages and their routed biogeochemical processes in Yunxiao Mangrove National Nature Reserve, China [J]. *Microbial Ecology*, 2019, 78(1): 57-69.
- [25] CHI Z, WANG W, LI H, et al. Soil organic matter and salinity as critical factors affecting the bacterial community and function of *Phragmites australis* dominated riparian and coastal wetlands [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 762: 1-8.
- [26] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [27] LI D, LIU C M, LUO R, et al. 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.
- [28] KANG D D, FROULA J, EGAN R, et al. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities [J]. *PeerJ*, 2015(3): 1-15.
- [29] PARKS D H, IMELFORT M, SKENNERTON C T, et al. CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes [J]. *Genome Research*, 2015, 25(7): 1043-1055.
- [30] MIKHEENKO A, PRJIBELSKI A, SAVELIEV V, et al. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(13): 142-150.
- [31] PARKS D H, CHUVOCHINA M, CHAUMEIL P A, et al. A complete domain-to-species taxonomy for bacteria and archaea [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(9): 1079-1086.
- [32] PARKS D H, RINKE C, CHUVOCHINA M, et al. Recovery of nearly 8, 000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life [J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2(11): 1533-1542.
- [33] QU W, LIN D, ZHANG Z, et al. Metagenomics investigation of agarlytic genes and genomes in mangrove sediments in China: A potential repertory for carbohydrate-active enzymes [J]. *Front Microbiol*, 2018(9): 1-16.
- [34] NGUYEN L T, SCHMIDT H A, VON H A, et al. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2015, 32(1): 268-274.
- [35] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 48(W1): W293-W296.
- [36] YAMADA K D, TOMII K, KATOH K. Application of the MAFFT sequence alignment program to large data-reexamination of the usefulness of chained guide trees [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(21): 3246-3251.
- [37] CRISCUOLO A, GRIBALDO S. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): A new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10(1): 1-21.
- [38] MISTRY J, FINN R D, EDDY S R, et al. Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(12): 1-10.
- [39] HYATT D, CHEN G L, LOCASCIO P F, et al. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11(1): 119-119.
- [40] CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, et al. BLAST + : Architecture and applications [J]. *BMC Bioinformatics*, 2009(10): 1-9.
- [41] MORIYA Y, ITOH M, OKUDA S, et al. KAAS: An automatic genome annotation and pathway reconstruction server [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007(35): W182-W185.
- [42] JAIN C, RODRIGUEZ R L, PHILLIPPY A M, et al. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 5114.
- [43] XU M, XIAO X, WANG F. Microbial diversity investigation and bioactive compounds screening in a metagenomic cosmid library from 5 274 m deep-sea sediment sample of nodule Province [J]. *Proceedings of Isea*, 2007(2005): 209-216.
- [44] SANTELLI C M, ORCUTT B N, BANNING E, et al. Abundance and diversity of microbial life in ocean crust [J]. *Nature*, 2008, 453(7195): 653-656.
- [45] HOLMES A J, TUJULA N A, HOLLEY M, et al. Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia [J]. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(4): 256-264.
- [46] GRAY C J, ENGEL A S. Microbial diversity and impact on carbonate geochemistry across a changing geochemical gradient in a karst aquifer [J]. *Official Journal of the International Society for Microbial Ecology*, 2013, 7(2): 325-337.
- [47] VAN K M A, SPETH D R, ALBERTSEN M, et al. Complete nitrification by a single microorganism [J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 555-559.
- [48] POGHOSYAN L, KOCH H, LAVY A, et al. Metagenomic recovery of two distinct comammox *Nitrospira* from the terrestrial subsurface [J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(10): 3627-3637.
- [49] PINCKNEY J L, PAERL H W, TESTER P, et al. The role of nutrient loading and eutrophication in estuarine ecology [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2001, 109(5): 699-706.
- [50] RABALAIS N N, TURNER R E, WISEMAN W J. Gulf of Mexico Hypoxia, A. K. A. "The Dead Zone" [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 2002, 33(1): 235-263.
- [51] USHIKI N, FUJITANI H, SHIMADA Y, et al. Genomic analysis of two phylogenetically distinct *Nitrospira* species reveals their genomic plasticity and functional diversity [J]. *Front Microbiol*, 2017(8): 1-12.
- [52] QIAN M, EATON J W, WOLFF S P. Cyanate-mediated inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity [J]. *Biochemical Journal*, 1997, 326(1): 159-166.
- [53] WIDNER B, MULHOLLAND M R, MOPPER K. Chromatographic determination of nanomolar cyanate concentrations in estuarine

- and sea waters by precolumn fluorescence derivatization [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(14): 6661-6666.
- [54] GANESH S, BERTAGNOLLI A D, BRISTOW L A, et al. Single cell genomic and transcriptomic evidence for the use of alternative nitrogen substrates by anammox bacteria [J]. *Official Journal of the International Society for Microbial Ecology*, 2018, 12(11): 2706-2722.
- [55] LUCKER S, NOWKA B, RATTEI T, et al. The genome of *Nitrospina gracilis* illuminates the metabolism and evolution of the major marine nitrite oxidizer [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013(4): 1-19.
- [56] SUN X, KOP L F M, LAU M C Y, et al. Uncultured Nitrospina-like species are major nitrite oxidizing bacteria in oxygen minimum zones [J]. *Official Journal of the International Society for Microbial Ecology*, 2019, 13(10): 2391-2402.
- [57] WALSH M A, OTWINOWSKI Z, PERRAKIS A, et al. Structure of cyanase reveals that a novel dimeric and decameric arrangement of subunits is required for formation of the enzyme active site [J]. *Structure*, 2000, 8(5): 505-514.
- [58] BORK P, KOONIN E V. A new family of carbon-nitrogen hydrolases [J]. *Protein Science*, 1994(3): 1344-1346.
- [59] PACE H C, BRENNER C. The nitrilase superfamily: Classification, structure and function [J]. *Genome Biology*, 2001, 2(1): 1-9.
- [60] BAYER B, SAITO M A, McILVIN M R, et al. Metabolic versatility of the nitrite-oxidizing bacterium *Nitrospira marina* and its proteomic response to oxygen-limited conditions [J]. *Official Journal of the International Society for Microbial Ecology*, 2021, 15(4): 1025-1039.
- [61] WATSON S W, BOCK E, VALOIS F W, et al. *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: A chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium [J]. *Archives of Microbiology*, 1986, 144: 1-7.
- [62] LEBEDEV A E V, ALAWI M, MAIXNER F, et al. Physiological and phylogenetic characterization of a novel lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium, 'Candidatus *Nitrospira bockiana*' [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58: 242-250.
- [63] CHARLES A M, SUZUKI I. Purification and properties of sulfite: Cytochrome oxido-reductase from *Thiobacillus novellus* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*, 1966, 128(3): 522-534.
- [64] NUBEL T, KLUGHAMMER C, HUBER R, et al. Sulfide: Quinone oxidoreductase in membranes of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus* (VF5) [J]. *Archives of Microbiology*, 2000, 173(4): 233-244.
- [65] WAKAI S, KIKUMOTO M, KANAO T, et al. Involvement of sulfide: Quinone oxidoreductase in sulfur oxidation of an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1 [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2004, 68(12): 2519-2528.
- [66] BODDICKER A M, MOSIER A C. Genomic profiling of four cultivated *Candidatus Nitrotoga* spp. predicts broad metabolic potential and environmental distribution [J]. *Official Journal of the International Society for Microbial Ecology*, 2018, 12(12): 2864-2882.
- [67] FÜSSEL J, LÜCKER S, YILMAZ P, et al. Adaptability as the key to success for the ubiquitous marine nitrite oxidizer *Nitrococcus* [J]. *Science Advances*, 2017, 3(11): 1-9.
- [68] PEDRONI P, VOLPE A D, GALLI G, et al. Characterization of the locus encoding the [Ni-Fe] sulfhydrogenase from the archaeon *Pyrococcus furiosus*: Evidence for a relationship to bacterial sulfite reductases [J]. *Microbiology*, 1995, 141(2): 449-458.
- [69] VIGNAIS P M, BILLOUD B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview [J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(10): 4206-4272.
- [70] LUCKER S, WAGNER M, MAIXNER F, et al. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(30): 13479-13484.
- [71] BALOGH S J, NOLLET Y H, SWAIN E B. Redox chemistry in minnesota streams during episodes of increased methylmercury discharge [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(19): 4921-4927.
- [72] 程皓, 陈桂珠, 叶志鸿. 红树林重金属污染生态学研究进展 [J]. *生态学报*, 2009, 29(7): 3893-3900.
- [73] 刘庆, 谢文军, 游俊娥, 等. 湿地沉积物重金属环境化学行为研究进展 [J]. *土壤*, 2013, 45(1): 8-16.
- [74] HOU L, XIE X, WAN X, et al. Niche differentiation of ammonia and nitrite oxidizers along a salinity gradient from the Pearl River estuary to the South China Sea [J]. *Biogeosciences*, 2018, 15(16): 5169-5187.
- [75] MAIXNER F, WAGNER M, LUCKER S, et al. Environmental genomics reveals a functional chlorite dismutase in the nitrite-oxidizing bacterium 'Candidatus *Nitrospira defluvi*' [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3043-3056.
- [76] SATO T, KOBAYASHI Y. The ars operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(7): 1655-1661.
- [77] SCHIERING N, KABSCH W, MOORE M J, et al. Structure of the detoxification catalyst mercuric ion reductase from *Bacillus* sp. strain RC607 [J]. *Nature*, 1991, 352(6331): 168-172.
- [78] GRACE S C. Phylogenetic distribution of superoxide dismutase supports an endosymbiotic origin for chloroplasts and mitochondria [J]. *Life Sciences*, 1990, 47(21): 1875-1886.
- [79] LINDSKOG S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 1997, 74(1): 1-20.
- [80] AKAI M, ONAI K, MORISHITA M, et al. Aquaporin AqpZ is involved in cell volume regulation and sensitivity to osmotic stress in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(24): 6828-6836.
- [81] CHANG G, SPENCER R H, LEE A T, et al. Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: A gated mechanosensitive ion channel [J]. *Science*, 1998, 282(5397): 2220-2226.
- [82] CAPP M W, PEGRAM L M, SAECKER R M, et al. Interactions of the osmolyte glycine betaine with molecular surfaces in water: Thermodynamics, structural interpretation, and prediction of m-values [J]. *Biochemistry*, 2009, 48(43): 10372-10379.

- [83] GIOVANNONI S J, TRIPP H J, GIVAN S, et al. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium [J]. *Science*, 2005, 309(5738): 1242-1245.
- [84] PENN K, JENSEN P R. Comparative genomics reveals evidence of marine adaptation in *Salinispora* species [J]. *BMC Genomics*, 2012(13): 1-12.
- [85] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNBASHI O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(11): 722-736.
- [86] TOCK M R, DRYDEN D T. The biology of restriction and anti-restriction [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(4): 466-472.
- [87] ANBA J, BIDNENKO E, HILLIER A, et al. Characterization of the lactococcal *abiD1* gene coding for phage abortive infection [J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(13): 3818-3823.
- [88] FINERAN P C, BLOWER T R, FOULDS I J, et al. The phage abortive infection system, *ToxIN*, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(3): 894-899.
- [89] GOLDFARB T, SBERRO H, WEINSTOCK E, et al. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes [J]. *The Embo Journal*, 2015, 34(2): 169-183.
- [90] SUTTLE C A. Marine viruses-major players in the global ecosystem [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(10): 801-812.
- [91] THOMAS C M, NIELSEN K M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(9): 711-721.
- [92] WEINBAUER M G, RASSOULZADEGAN F. Are viruses driving microbial diversification and diversity? [J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(1): 1-11.
- [93] CAMBILLAU C, CLAVERIE J M. Structural and genomic correlates of hyperthermostability [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(42): 32383-32386.
- [94] SUHRE K, CLAVERIE J M. Genomic correlates of hyperthermostability, an update [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(19): 17198-17202.
- [95] SAUER D B, WAGNER M. Prediction of optimal growth temperature using only genome derived features [J]. *Bioinformatics*, 2018(18): 1-27.

(责任编辑: 李万会)