

• 环境生物技术 •

基于宏基因组分析纳帕海高原湿地微生物及其碳氮代谢多样性

徐志伟, 陈学梅, 魏云林, 张琦, 季秀玲

昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

徐志伟, 陈学梅, 魏云林, 等. 基于宏基因组分析纳帕海高原湿地微生物及其碳氮代谢多样性. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3276-3292.

Xu ZW, Chen XM, Wei YL, et al. Metagenomic analysis of the diversity of microbes in the Napahai plateau wetland and their carbon and nitrogen metabolisms. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3276-3292.

摘要: 由于地理位置特殊和生态系统类型的复杂多样性, 高原湿地在水源供给、温室气体调节、生物多样性保护等方面具有不可忽视的生态作用。纳帕海高原湿地是特殊的低纬度高海拔湿地类型, 目前关于其微生物多样性的研究较少。文中基于宏基因组学方法对纳帕海高原湿地微生物的基因组进行测序, 在细菌域中鉴定出 184 个门、3 262 个属、24 260 个种; 在古菌域中检测到 13 个门、32 个属; 在真菌域中共有 13 个门、47 个属。土壤和水体的物种多样性具有明显差异: 在门水平上, 土壤中酸杆菌门、变形菌门和放线菌门为优势菌门, 水体则以变形菌门和拟杆菌门为主。通过宏基因组分析获得纳帕海微生物群落的多样性数据, 并对高原湿地中固碳途径和氮代谢途径进行了初步分析。研究表明碳、氮代谢基因丰度较高, 湿地微生物固碳途径主要以卡尔文循环、还原性三羧酸循环和 3-羟基丙酸循环为主, 变形菌门、绿弯菌门、泉古菌门为主要固碳菌群; 对于氮循环, 水中以固氮和异化硝酸盐还原过程为主, 土壤则以硝化和反硝化过程为主, 变形菌门、硝化螺旋菌门、疣微菌门、放线菌门、奇古菌门和广古菌门的微生物为氮循环的主要贡献者。本研究揭示的纳帕海高原湿地微生物多样性, 为湿地环境的综合治理和保护提供了新的知识。

关键词: 纳帕海高原湿地, 微生物群落, 宏基因组学, 碳氮代谢, 生物多样性

Metagenomic analysis of the diversity of microbes in the Napahai plateau wetland and their carbon and nitrogen metabolisms

Zhiwei Xu, Xuemei Chen, Yunlin Wei, Qi Zhang, and Xiuling Ji

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: Due to the special geographical location and the complex ecosystem types, plateau wetlands play important ecological roles in water supply, greenhouse gas regulation and biodiversity preservation. Napahai plateau wetland is a special

Received: October 14, 2020; **Accepted:** February 1, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31860147, 31700324).

Corresponding author: Xiuling Ji. Tel: +86-871-65920147; E-mail: jixiuling1023@126.com

国家自然科学基金 (Nos. 31860147, 31700324) 资助。

wetland type with low latitude and high altitude, and its microbial diversity was rarely studied. The diversity of microbial communities in the Napahai plateau wetland was analyzed using metagenomics method. Among the microbes detected, 184 phyla, 3 262 genera and 24 260 species belong to the bacterial domain, 13 phyla and 32 genera belong to the archaeal domain, and 13 phyla and 47 genera belong to the fungal domain. Significant differences in species diversity between soil and water were observed. Acidobacteria, Proteobacteria and Actinobacteria were dominant phyla in soil, while Proteobacteria and Bacteroides were dominant phyla in water. Since the carbon and nitrogen metabolism genes were abundant, the pathways of carbon fixation and nitrogen metabolism were analyzed. Calvin cycle, reductive tricarboxylic acid cycle and 3-hydroxypropionic acid cycle were the main carbon fixation pathways, while Proteobacteria, Chloroflexi, and Crenarchaeota were the main carbon-fixing bacteria group. As for the nitrogen cycle, nitrogen fixation and dissimilatory nitrate reduction were dominant in water, while nitrification and denitrification were dominant in soil. Proteobacteria, Nitrospirae, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Thaumarchaeota and Euryarchaeota contributed to the nitrogen cycle. The study on microbial diversity of Napahai plateau wetlands provides new knowledge for the comprehensive management and protection of wetland environment in China.

Keywords: Napahai plateau wetlands, microbial community, metagenomics, carbon and nitrogen metabolisms, biodiversity

微生物是地球上最丰富的资源, 据估算地球上共有 10^6 – 10^8 种微生物^[1]。微生物与人类社会和生态环境的发展息息相关, 也是地球上最为庞大的生物群体。它包含了细菌、真菌、病毒以及一些小型原核生物等。这些微生物被广泛应用于工业、农业、食品医药等各个方面^[2-3]。这些微生物有的可以在高温、高盐、高碱和高辐射等极端环境中生存, 为人类提供了珍贵的特殊基因资源^[4-6]。从显微镜的发明到青霉素的发现, 从最先的观察到微生物的培养, 我们正逐渐揭开这些微小但庞大的微生物的神秘面纱。分子生物学的快速发展使人们能够从微观角度对微生物进行探索, 从功能基因研究到基因组的解析, 甚至利用分子工具对微生物的基因和性状进行定向改造^[7-8]。然而这些研究的前提是能够实现对微生物的分离培养。随着技术的不断创新, 宏基因组学的出现为微生物的研究打开了新的局面。

1998年 Handelsman 等首次提出宏基因组的概念, 其定义为“*The genomes of the total microbiota found in nature*”, 即环境中全部微小生物遗传物质的总和, 包括可培养和不能培养的微生物; 其优势是能够绕过微生物的分离和培养过程, 成为研究环境样品中 90% 不可培养的微生物的有力手段^[9]。宏基因组学 (Metagenomics) 结合

分子生物学技术, 提取群落中微生物基因组进行高通量测序, 运用生物信息学方法进行分析^[10]。宏基因组学的出现克服了传统微生物研究方式的缺陷, 摆脱了物种界限, 让环境微生物资源能够更好地被人类利用。

高原湿地是在特定的高寒环境下由水陆相互作用而形成的, 主要分布于中国青藏高原、云贵高原和蒙新高原。纳帕海湿地位于中国滇西北金沙江流域, 是低纬度、高海拔的季节性沼泽湿地。纳帕海高原湿地作为中国独特的湿地类型, 其研究价值非常高。湿地微生物构成了整个生态系统的基石。微生物群落多样性反映了微生物与环境之间的关系, 也深刻地影响着局部地区生态系统的组成和平衡。微生物在维持湿地生态系统中土壤肥力、植被生产力和生物圈的物质循环和转化方面发挥着重要的作用^[11]。湿地土壤中的微生物在“能量平衡”特别是碳氮平衡中扮演重要角色。自然界中的氮素要进入生态系统循环, 需要微生物将氮气转化为氨或铵盐, 其中固定氮素的微生物有固氮菌、蓝绿藻和根瘤菌等。然后通过微生物的硝化作用形成亚硝酸盐或硝酸盐, 被绿色植物吸收并转化为氨基酸, 合成蛋白质。为避免硝酸盐在土壤中累积过多, 微生物通过反硝化作用将硝酸盐转化为游离的氮返回大气中^[12]。整个氮

素循环中微生物在固氮、氨化、反硝化、硝化等方面起到关键作用。对于碳素循环, CO₂ 是所有碳循环的中心, 大多来自生物分解作用, 微生物还能通过光合作用和化能合成作用来固定 CO₂, 从而推动生物圈中碳元素的转化和循环^[13]。纳帕海高原湿地微生物含量丰富、生物多样性高, 为了解碳氮循环过程和地球元素循环提供了基础。本研究借助新一代高通量测序技术, 获得了纳帕海高原湿地的宏基因组数据, 并通过比较宏基因组学分析纳帕海高原湿地微生物的群落结构以及对碳氮循环的贡献。

1 材料与方法

1.1 纳帕海高原湿地样本采集

根据典型性和可行性原则, 于 2019 年 5 月 23 日在纳帕海 E99°38'24"–E99°40'38"和 N27°48'34"–N27°53'36"范围内采集水样和土样。由于土壤的不均匀性, 在纳帕海高原湿地的两侧各选取 8 个样点, 呈“S”形分布, 对每一个样点均选取表面植被相似或者土壤类型条件相对接近的区域, 土层深度约为 10 cm, 每一个样点采取 5 kg 土样, 8 个采样点采集的土壤样品等量混合 (250 g) 从而构成一份土壤样品。由于纳帕海湖水面积很广, 故水样采用就近原则取样, 对于样点的选择尽可能覆盖湖的周围, 每一个样点采取 25 kg 水样后再等量混合样品作为一个水样。样品采集同时记录采样点经纬度、海拔高度、气温、大气压、pH 值, 水样暂存于无菌储水桶, 土样暂存无菌密封袋, 最终保存在实验室 4 °C 冷库。(注: 研究样品为两份土样 S1 和 S2、一份水样 W, 并做了 3 个平行)。

1.2 宏基因组 DNA 提取和高通量测序

对获取的土壤和水体样本在 24 h 内采用 QIAamp DNA 试剂盒 (Qiagen) 提取宏基因组 DNA, 利用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳 (BioRad) 和 NanoDrop 分光光度计 (Thermo) 对分离纯化后

的 DNA 进行检测和评价。

样品送往广州美格基因生物科技有限公司进行文库构建和高通量测序。运用超声法将基因组片段随机直接打断, 产生 ≤800 bp 的 DNA 片段, 利用 T4 DNA 聚合酶等修补被打断的粘性末端使之成为平末端, 碱基 A 加在 3'端, 使其连接 3'端带有 T 碱基的特殊接头, 最后电泳回收连接目的产物片段, PCR 扩增带有特殊接头的 DNA 片段^[14-16]。经检验合格的文库进行片段簇制备和测序, 得到测序数据 20 Gb。

1.3 生物多样性和功能分析

将获得的宏基因组数据, 利用 MEGAN 5 和 MG-RAST 宏基因组平台 (<http://metagenomics.anl.gov/>) 进行分析, 首先将 GenBank 非冗余 (NR) 数据库下载到本地服务器, 进行格式化后利用自编的脚本程序, 将宏基因组序列与非冗余数据库进行批量 BLAST。然后将序列比对结果加载到 MEGAN 5 软件包中进行数据分析, 以统计各个生物类群的物种丰度。利用软件 metaphlan 2 将序列片段快速分类到物种上, 作为基于 NR 数据库的物种注释方法的补充。利用预测出来的基因蛋白序列与 KEGG (Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes)、eggNOG、CAZyme 等数据库比对获得功能注释信息, 揭示宏基因组中微生物功能整体轮廓。针对纳帕海高原湿地在氮素循环及碳水化合物代谢方面具有的特殊优势, 利用 MEGAN 5 提取出和碳固定途径和氮循环相关基因序列, 提交到 GenBank NR 数据库中, 使用 BLASTX 进行序列比对, 利用 KEGG 进行分析^[17]。

2 结果与分析

2.1 纳帕海微生物群落概述

湿地生态系统中具有丰富的微生物多样性, 但由于传统分离培养方法的限制只能获得少部分微生物的纯培养, 仍然有 90% 的微生物无法由纯培养获得。本研究采用高通量测序技术首次对纳帕

海高原湿地的微生物群落多样性和组成进行研究。采集的土壤和水体样本中共获得了 11 273 001 条高质量宏基因组 DNA 序列,检测到有确定分类信息的细菌群落 184 个门类、723 个科、3 262 个属、24 260 个种。4 个生物域中,大多数序列归属于细菌域 (3 566 920 条序列,占 63%),其余序列被分配到真核域 (859 条序列,占 0.02%) 和古菌域 (23 607 条序列,占 0.4%)。值得注意的是,宏基因组序列中大量高质量的序列 (2 053 424 条序列,占 36.58%) 并未匹配到任何生物域,这说明现有的生物信息数据库中已知的生物序列与这些未知序列没有相关性或者亲缘关系非常远,因此也说明纳帕海高原湿地生态系统中蕴藏着丰富的生物多样性。

2.2 细菌域的生物组成和数量

细菌域有 184 个不同的门,包括变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、念珠菌门 (Candidatus Rokubacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 和浮霉菌门 (Planctomycetes) 等 9 个门;纲水平上,土壤中相对丰度较高的是放线菌纲 (Actinobacteria)、 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria)、 β -变形菌纲 (Betaproteobacteria) 和 δ -变形菌纲 (Deltaproteobacteria),而水体则主要是 β -变形菌纲 (Betaproteobacteria)、 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、丰祐菌纲 (Opitutae)、 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 和放线菌纲 (Actinobacteria)。细菌域有 3 262 个属,其中土壤中占优势的属主要包括厌氧杆菌属 (*Anaeromyxobacter*) 和缓生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*),水体中优势属是弯曲杆菌属 (*Curvibacter*)、浮游藻属 (*Limnohabitans*)、嗜甲基菌属 (*Methylophilus*)、甲基化菌属 (*Methylotenera*)、多核杆菌属 (*Polynucleobacter*) 和无色杆菌属 (*Rhodoferrax*); 细菌域有 24 260 个种,土壤中优势种包括酸杆菌 (*Acidobacteria bacterium*)、

放线菌 (*Actinobacteria*)、 δ -变形菌 (*Deltaproteobacteria bacterium*)、念珠菌 (*Candidatus Rokubacteria bacterium*)、 β -变形菌 (*Betaproteobacteria bacterium*) 和 α -变形菌 (*Alphaproteobacteria bacterium*), 水体中优势种是 β -变形菌 (*Betaproteobacteria bacterium*)、 δ -变形菌 (*Deltaproteobacteria bacterium*) 和绿弯曲菌 (*Chloroflexi bacterium*) 等。

变形菌门 (Proteobacteria) 是纳帕海湿地最丰富的门 (1 217 325 条序列,占 34%) (图 1)。变形菌是细菌中最大的一个门,属于革兰氏阴性细菌,种类繁多,包括 α -变形菌 (Alphaproteobacteria)、 β -变形菌 (Betaproteobacteria)、 δ -变形菌 (Deltaproteobacteria)、 ϵ -变形菌 (Epsilonproteobacteria) 和 γ -变形菌 (Gammaproteobacteria) 5 个纲^[18]。不同的生态环境中,变形菌门 (Proteobacteria) 均属于第一优势菌门,但每一种生态环境中的优势菌亚类构成却相差甚远。研究表明, β -变形菌 (Betaproteobacteria) 是河流和湖泊生态系统中典型的优势菌群^[19]; α -变形菌 (Alphaproteobacteria) 和 β -变形菌 (Betaproteobacteria) 是森林生态系统土壤中细菌群落的优势菌群^[20]; γ -变形菌 (Gammaproteobacteria) 是海水和沉积物中常见的细菌菌群^[21-22]。本研究发现,变形菌门 (Proteobacteria) 同样是纳帕海高原湿地生态环境中丰度最高的细菌,其中 α -变形菌 (Alphaproteobacteria) 和 β -变形菌 (Betaproteobacteria) 是最丰富的 2 个纲。 α -变形菌 (Alphaproteobacteria) 是人工湿地的优势菌纲^[23], β -变形菌 (Betaproteobacteria) 与崇明东滩湿地生态系统中的优势菌纲相同^[24], 因此 β -变形菌 (Betaproteobacteria) 不仅在河流湖泊中丰度高,也可能是淡水湿地中的优势菌纲。第二优势菌是放线菌门 (Actinobacteria), 属于革兰氏阳性细菌,多数能够降解纤维素和几丁质,使土壤中的有机质降解,为土壤提供养分。由于它们可以在低温下保持较高的活性和 DNA 修复能力,其

产生的体外孢子还能抵抗外界不利的环境条件,因此成为低温环境中的一大优势菌群^[25],同时也常常是许多淡水生态系统的优势菌群^[26]。位于我国滇西北的纳帕海湿地属于第四季水蚀、冰渍湖、深处三江并流保护区腹地,是我国长江中下游地区的重要水源地,其生态环境比较适合放线菌门(*Actinobacteria*)微生物的生长,它们与溶解性有机碳含量相关,因此成为纳帕海高原湿地土壤中相对丰度第二高的细菌菌群。纳帕海高原湿地年平均温度在 5.4 °C 左右,属于低温环境,因此得到的优势细菌菌群为变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*),这与多数西伯利亚和北极等低温环境土壤中细菌在门的分类水平一致^[27-28],这些菌群可能由于特殊的耐低温代谢机制,能够适应低温环境而长期存在;而且酸杆菌门(*Acidobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、念珠菌门(*Candidatus Rokubacteria*)在低温土壤中也属于主要优势菌群^[29-30]。纳帕海高原湿地土壤呈弱酸性,适合酸杆菌等微生物的生长繁殖,所以该菌群也是优势菌群,*Chloroflexi*、*Verrucomicrobia*、*Candidatus Rokubacteria*等菌群虽然不是绝对优势菌群,但是它们仍属于丰度较高的菌群。

在门层级上,纳帕海高原湿地水体和土壤中微生物的丰度差异很大(表 1),从表中可以看出土壤中的酸杆菌门、放线菌门、绿弯菌门等丰度高于水体,但水体中的变形菌含量显著高于土壤。与同类型的纳木错高原湿地以及不同类型的三江平原湿地相比^[31],微生物类型大体相似但其微生物丰度具有明显差异;纳帕海湿地土壤中变形菌门和放线菌门丰度低于其他湿地,酸杆菌含量高于其他湿地。与淡水湖泊相比较^[32],纳帕海水体中微生物丰度接近于淡水湖泊,土壤中除变形菌门和酸杆菌门丰度低于淡水湖泊外,总体也接近于淡水湖泊。这些差异与纳帕海高原湿地的独特地理位置有关,也说明了湿地生态系统和其他湖

泊生态系统之间存在特殊的联系。纳帕海高原湿地是中国生物多样性热点地区之一,具有重要的研究价值。但由于该湿地属于孤立且分散的生态系统、农牧交错、人类肆意大规模开发和利用、湖滨沼泽被排干垦殖、湿地面积急剧缩小、土壤退化、生物多样性逐步丧失,因此湿地生态系统亟待恢复和保护。从纳帕海湿地细菌群落的多样性分析,主要优势菌群为变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*),这与多种土壤环境中的优势菌群一致^[33]。绿弯菌门(*Chloroflexi*)是一类通过光合作用产生能量的细菌,它们具有绿色的色素,包括作为反应中心的菌绿素和作为天线分子的菌绿素,通常位于称作绿体的微囊中,采用特殊的 3-羟基丙酸途径合成有机物^[30]。前期对纳帕海湿地细菌群落的研究显示 *Chloroflexi* 属于主要优势菌群之一,且在其他湿地中未见报道,故而属于纳帕海湿地中独特的菌种资源。纳帕海湿地是我国境内唯一高海拔低纬度地区,常年光照时间长,适合 *Chloroflexi* 的细菌生长。但是 *Chloroflexi* 的丰度相比于过去降低了很多,说明这些年受人类放牧和开垦的影响,植被破坏严重,土壤肥力流失。*Verrucomicrobia*、*Candidatus rokubacteria* 等微生物其丰富度与人类活动息息相关,反映了纳帕海湿地受人为活动干扰的程度^[18]。土壤和水环境中出现了较高含量的 *Verrucomicrobia*、*Candidatus rokubacteria*,说明受人类活动的影响,湿地环境受到了严重的污染。纳帕海高原湿地“新菌种资源”的研究不仅揭示了土壤细菌群落的多样性,对于湿地环境的治理方面也提供了重要的指示作用。微生物对环境变化敏感,可以利用微生物种类、数量、各种酶(脱氢酶、尿素酶、蛋白酶、磷酸酶)和生物化学反应(硝化、反硝化)等作为湿地土壤的状况指标,及时地对人类污染活动以及放牧等生产活动作出限制,保护湿地生态环境。随着分类单元从门到种的变化(图 1),细菌群落未确定分类的信息逐渐

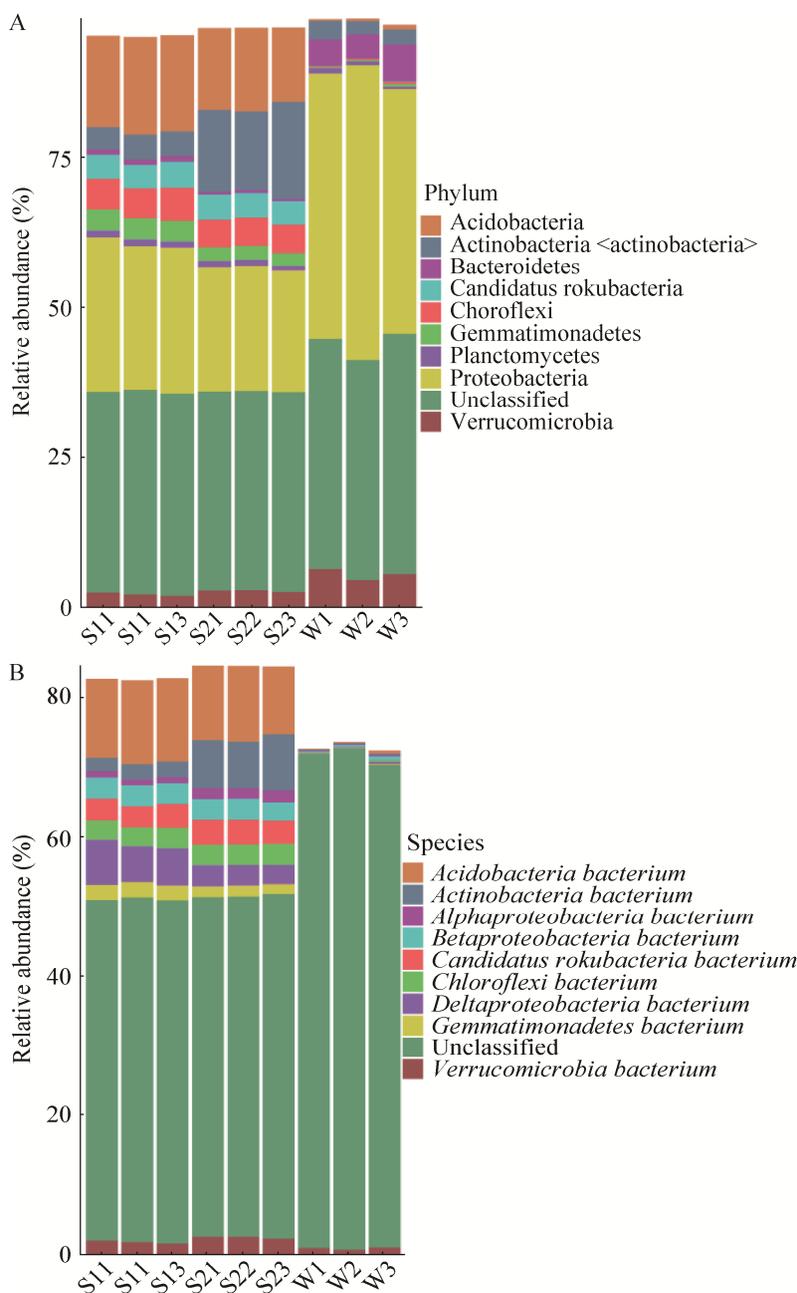


图1 细菌群落组成及其相对丰度 (门水平&种水平)

Fig. 1 Bacterial community composition and their relative abundance (phylum level and species level).

增加, 从门的 30%到种的 86%, 由于分类信息的精确化, 数据库中能够比对的分类信息逐渐减少, 因此纳帕海高原湿地细菌群落的研究中可能蕴藏着许多新的细菌物种。

2.3 古菌域、真核域和群落分析

古菌和真菌群落的微生物多样性显著低于

细菌群落。纳帕海高原湿地宏基因组中共检测到古菌域 (23 607 条序列) 的 13 个门、32 个属。奇古菌门 (Thaumarchaeota) 是最丰富的门 (13 181 条序列, 占 56%), 其次为广古菌门 (Euryarchaeota) (7 061 条序列, 占 30%)、深古菌门 (Bathyarchaeota) (1 166 条序列, 占 5%) 和泉

古菌门 (Crenarchaeota) (412 条序列, 占 2%)。在多种生态系统中, 泉古菌门 (Crenarchaeota) 和广古菌门 (Euryarchaeota) 均为优势菌门。然而在纳帕海高原湿地土壤中, 虽然检测到了上述的两个古菌门, 但奇古菌门 (Thaumarchaeota) 为优势菌门, 相对丰度最高。奇古菌门是一类定义较晚的古菌门, 在碳、氮和硫等重要元素的地球生物化学循环中发挥重要作用^[34]。奇古菌门在纳帕海湿地中相对丰度占比高达 56%, 且已知该门中大部分都是氨氧化古菌, 与碳循环相关并参与土壤的氨氧化作用, 故推测奇古菌门在纳帕海高原湿地的氮素循环中扮演重要角色。深古菌门 (Bathyarchaeota) 是一类典型的未培养微生物, 普遍存在于全球海洋沉积物中并具有高丰度, 研究报道深古菌具有降解蛋白质的能力, 在某些亚群中还发现了与产甲烷相关的代谢途径。冯晓远等揭示深古菌 B242 基因组具有以降解蛋白质和多种碳水化合物为主

的异养代谢途径, 同时通过还原型乙酰辅酶 A 途径实现自养方式^[35]。我们推测深古菌门对纳帕海湿地的碳循环产生了重要影响。在古菌群落中检测到的已知菌群大部分属于功能菌群, 而古菌群落中的功能菌群和细菌群落中的功能菌群如何相互协调值得深入探讨。

真核域 (859 条序列) 共检测到 13 个门、47 个属, 其中链形植物门 (Streptophyta) 是最大的门 (包含 638 条序列), 其次是子囊菌门 (Ascomycota) (包含 342 条序列) 和脊索动物门 (Chordata) (包含 257 条序列)。主要属包括赤霉属 (*Gibberella*)、茎点霉属 (*Phoma*)、附球菌属 (*Plectosphaerella*) 和漆斑菌属 (*Myrothecium*)。链形植物门包括轮藻门和有胚植物 (苔藓维管植物) 等, 常分布于淡水环境中, 如淡水湖泊、沼泽、稻田。陆梅等和陈伟等对纳帕海高原湿地真菌群落的多样性研究中并未发现链形植物门为主要优势门, 可能是研究方法不同导致的差异^[36-37]。子囊菌门也是纳帕海湿地中的

表 1 纳帕海高原湿地与不同湿地和淡水湖泊门层级微生物丰度差异

Table 1 Differences in microbial abundance at the phylum level between Napahai plateau wetland and different wetlands and freshwater lakes

Different bacterial phyla classification	Napahai plateau Wetland (soil) (%)	Napahai plateau wetland (water) (%)	Tibetan plateau wetland (%)	Sanjiang plain wetland (%)	Ganjiang river (%)	Yao lake (%)	Raohe river (%)	Boyang lake (%)
Proteobacteria	20	45	28	33	53.7	46.97	40.65	33.64
Acidobacteria	13	1	4	20	0.36	0.01	0.15	23.85
Actinobacteria	13	3	30	17	8.99	18	23.47	5.64
Verrucomicrobia	3	5			6.5	5.0	7.57	3.48
Chloroflexi	4.5	0.1	25	16	0.09	0	0	0
Candidatus Rokubacteria	4	0.02						
Bacteroidetes	0.3	8	6	3	17.98	24.65	16.07	11.71
Gemmatimonadetes	2	0.08	3	0.1	0.12	0.19	0.04	0.11
Planctomycetes	0.9	0.02	2	2	1.13	1.84	0.57	1.65
Firmicutes			1	2	2.5	0.37	0.74	1.06

Note: Data for Tibetan Plateau Wetland and Sanjiang Plain Wetland are from [31], while data for Ganjiang River, Yao Lake, Raohe River, Poyang Lake were from [32].

优势菌门,这与前期发现子囊菌门广泛存在于淡水中的结论相一致^[37]。在属的水平上,由于植物的根际效应对真菌群落的多样性具有主导作用,从而导致优势属的差别。本研究发现真菌群落中赤霉属为相对优势属。值得注意的是,赤霉属大多是具有破坏性的植物病原真菌,感染的植物会出现生长缓慢和死亡,对该病原不敏感的微生物将大量生长,取代原有的优势物种,从而导致植物物种的多样性降低,引起植物群落改变^[38]。赤霉属的出现对纳帕海高原湿地的植物群落和生态环境带来哪些影响,如何防止赤霉属可能导致的湿地植物多样性的减少已成为亟需解决的难题。在分类单元从门到属的变化过程中,由于绝大多数真菌都是未知的,能够正式描述的只有不到 10%,因此较细菌而言,真菌群落未确定的分类信息更高,有待进一步研究。

2.4 纳帕海高原湿地宏基因组功能分析

利用 Diamond 软件将非冗余基因集序列与 KEGG 数据库进行基因同源性比对。对纳帕海高原湿地中功能基因进行注释。KEGG 一级代谢途

径以及对应基因丰度信息如图 2 所示,在第一层级的 7 个子系统中,简化层次结构 (Brite hierarchies) 基因的丰度最高 (1 464 089 条基因序列,占 37.36%),其次是代谢 (Metabolism) 相关基因 (1 069 533 条基因序列,占 27.29%)。其他高丰度的包括环境信息处理 (Environmental information processing) (322 804 条基因序列,占 8.24%)、细胞过程 (Cellular processes) (228 855 条基因序列,占 5.84%) 和遗传信息处理 (Genetic information processing) (211 658 条基因序列,占 5.4%)。进一步采用二级 KEGG 数据库对功能基因注释 (图 3)。从图 4 中可以看到基因丰度比较高的是蛋白质家族:信号传导和细胞进程 (Protein families: signaling and cellular processes) (693 913 条基因序列)、蛋白质家族:遗传信息处理 (Protein families: genetic information processing) (554 524 条基因序列) 和蛋白质家族:代谢 (Protein families: metabolism) (346 679 条基因序列)。其次丰度较高的分别是氨基酸代谢 (Amino acid metabolism) (294 270 条基因序列) 和

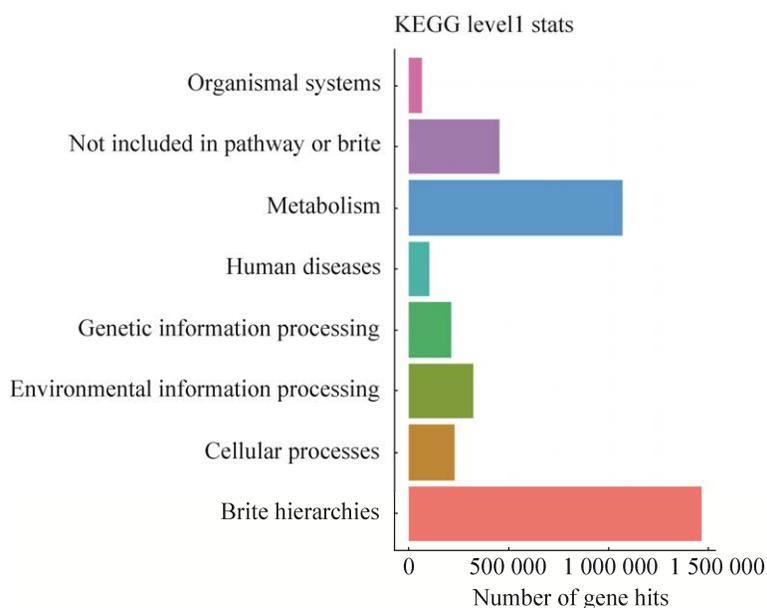


图 2 细菌群落功能注释 (KEGG level1 stats)

Fig. 2 Functional annotation of bacterial community (KEGG level1 stats).

☎: 010-64807509

✉: cjb@im.ac.cn

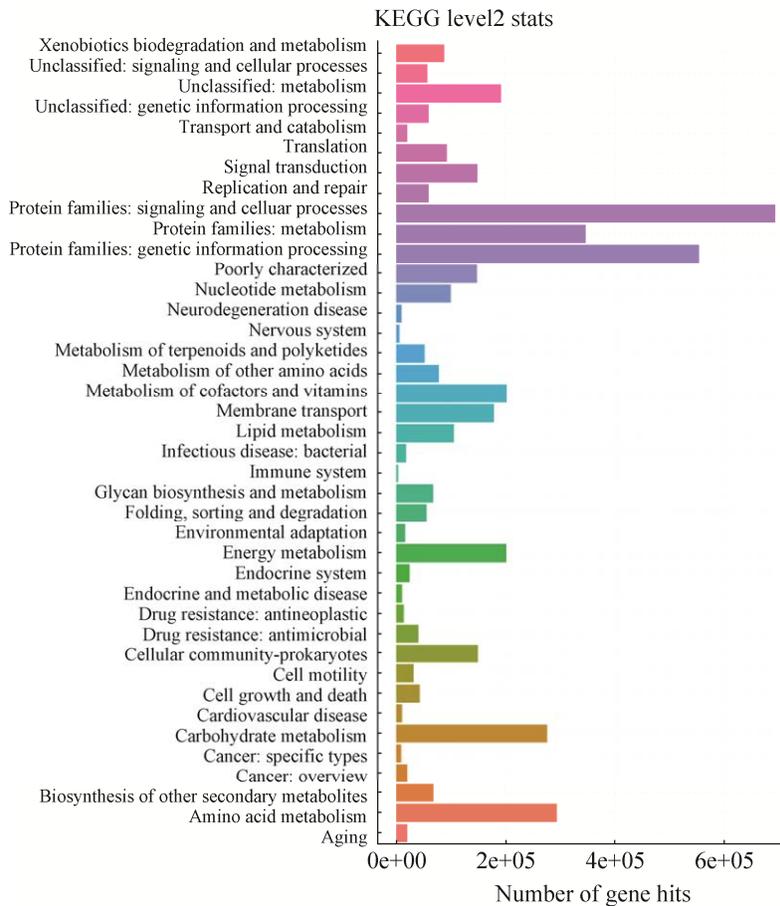


图3 细菌群落功能注释 (KEGG level2 stats)

Fig. 3 Functional annotation of bacterial community (KEGG level2 stats).

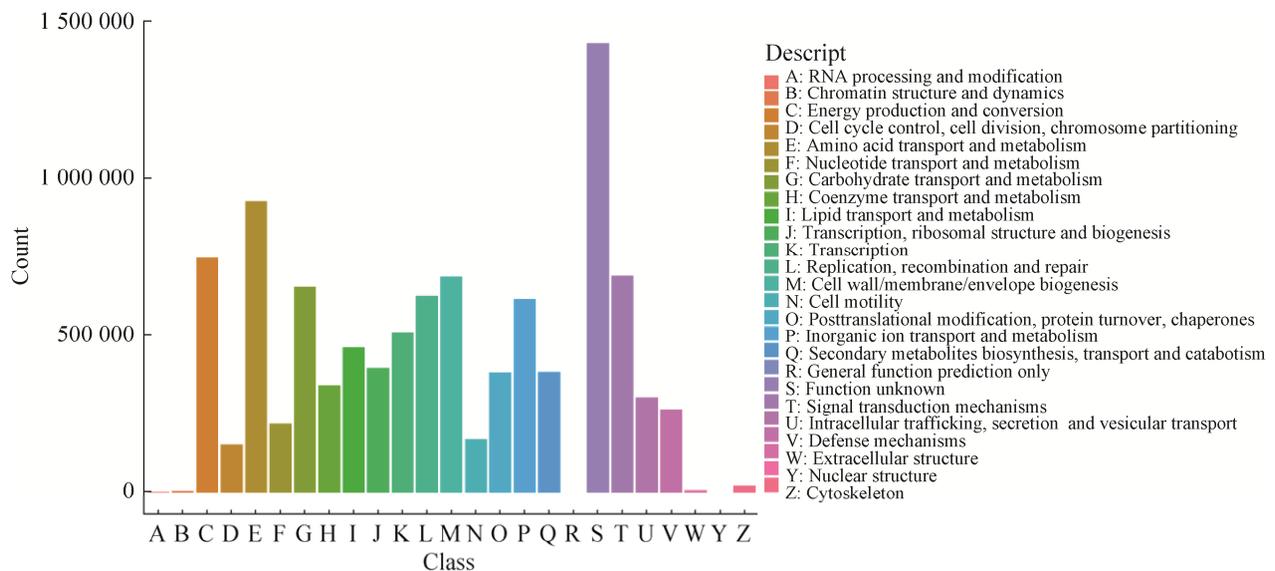


图4 细菌群落 eggNOG 功能类别基因数目柱状图

Fig. 4 Histogram of the number of genes in functional categories of eggNOG in bacterial communities. the ordinate corresponding to the bar graph refers to the number of genes annotated and the abscissa represents the code of each functional type of eggNOG. The corresponding full names are presented on the right side of the figure.

碳水化合物代谢 (Carbohydrate metabolism) (276 194 条基因序列)。挑选了原核生物的基因序列与 eggNOG 数据库进行比对,得到基因功能分类和基因数目统计见图 4 所示,丰度最高的是未知功能基因有 1 434 518 条,其次是氨基酸运输和代谢基因有 927 911 条,能量产生与转换的基因有 748 750 条,碳水化合物的运输和代谢基因有 656 373 条,与信号转导机制、辅酶转运和代谢、脂质转运和代谢、DNA 复制和修复等相关的基因具有较高丰度。这些与蛋白质、氨基酸、核苷酸、碳水化合物代谢等相关的功能基因与纳帕海高原湿地中各个生物类群的生长和存活密不可分。

从 KEGG 和 eggNOG 数据库的注释结果发现,碳水化合物代谢相关基因在纳帕海高原湿地中占有较高比例。湿地是自然界生物多样性最丰富和生态功能最强的生态系统,在全球生物地球化学循环中发挥巨大作用^[39]。湿地微生物在碳元素的固定方面具有重要贡献,这也验证了宏基因组数据中含有高比例碳水化合物代谢的基因。氮元素反映湿地营养水平,是湿地土壤的限制性成分,土壤中的氮素含量的变化对湿地生态系统的结构、功能及生产力影响显著^[34]。

2.5 纳帕海高原湿地微生物群落碳固定途径

从 20 世纪起,地球系统碳循环成为人类重点关注的三大主题之一。温室气体、全球变暖、土地利用等重大全球性问题都与生态系统碳循环有密切联系^[40]。湿地作为地表最强的生态系统,其微生物的固碳途径值得关注。微生物固定 CO₂ 途径多种多样,主要有 4-羟丁酸双羧酸循环、卡尔文循环、还原性三羧酸循环、3-羟基丙酸循环、还原性乙酰 CoA 通路^[41]。纳帕海高原湿地水体和土壤微生物固碳途径差异明显 (图 5)。水体中 4-羟丁酸双羧酸循环基因 (*ppc*) 和卡尔文循环基因 (*gapA*、*rbcS*、*prkB*、*pgk*、*rpiA*、*rbcL*) 占主要丰度,而土壤中还原性三羧酸循环基因 (*porB*、*porD*、*porG*、*korD*、*korG*)、3-羟基丙酸循环基因

(*accA*) 和还原性乙酰 CoA 通路基因 (*fdhB*、*cooS*) 具有较高丰度。这说明水中固碳途径主要是卡尔文循环和 4-羟丁酸双羧酸循环;土壤中固碳途径主要是还原性三羧酸循环、3-羟基丙酸循环和还原性乙酰 CoA 通路。变形菌门、绿弯菌门、泉古菌门为主要固碳菌群,其中贡献较大的是 α -变形菌纲、 β -变形菌纲、 δ -变形菌纲、绿弯菌纲和热变形菌目。

根据对碳代谢过程相关基因的分析,发现基因组中许多基因参与中央碳代谢,包括糖酵解途径、糖异生途径和三羧酸 (TCA) 循环等 (图 6),这与纳帕海宏基因组功能注释结果中碳代谢通路占较高比例一致。图 6 显示了纳帕海高原湿地宏基因组中检测到的基因对应的酶和其参与的代谢途径。红色代表一些高丰度碳代谢基因所对应的酶:糖酵解和糖异生途径中有甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、磷酸甘油酸激酶 (PGK)、丙酮酸脱氢酶 (PDH)、丙酮酸羧化酶 (PC)、丙酮酸合成酶 (PS); TCA 循环途径中有异柠檬酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶 (ICD)。说明糖酵解和糖异生途径在纳帕海湿地碳循环过程中比较活跃,糖酵解途径是存在于一切生物体内糖分解代谢的普遍机制,为生命活动提供能量,尤其是厌氧生物获得能量的主要方式;而糖异生途径则是非糖物质转化为糖的重要途径。

2.6 纳帕海高原湿地微生物与氮循环

氮循环是指含氮化合物经一系列化学过程互相转化循环,从而实现氮元素的物质循环。微生物参与的氮循环不仅影响土壤的生产力和可持续性,而且对全球气候具有重要影响^[42]。氮循环是一个复杂的系统,其中微生物主要参与固氮作用、硝化作用和反硝化作用等^[43]。纳帕海高原湿地中存在丰富的氨氧化微生物,包括氨氧化细菌 (Ammonia oxidizing bacteria, AOB) 和氨氧化古菌 (Ammonia oxidizing archaea, AOA)。陈伟等通过构建基因克隆文库分析 *amoA* 功能基因、

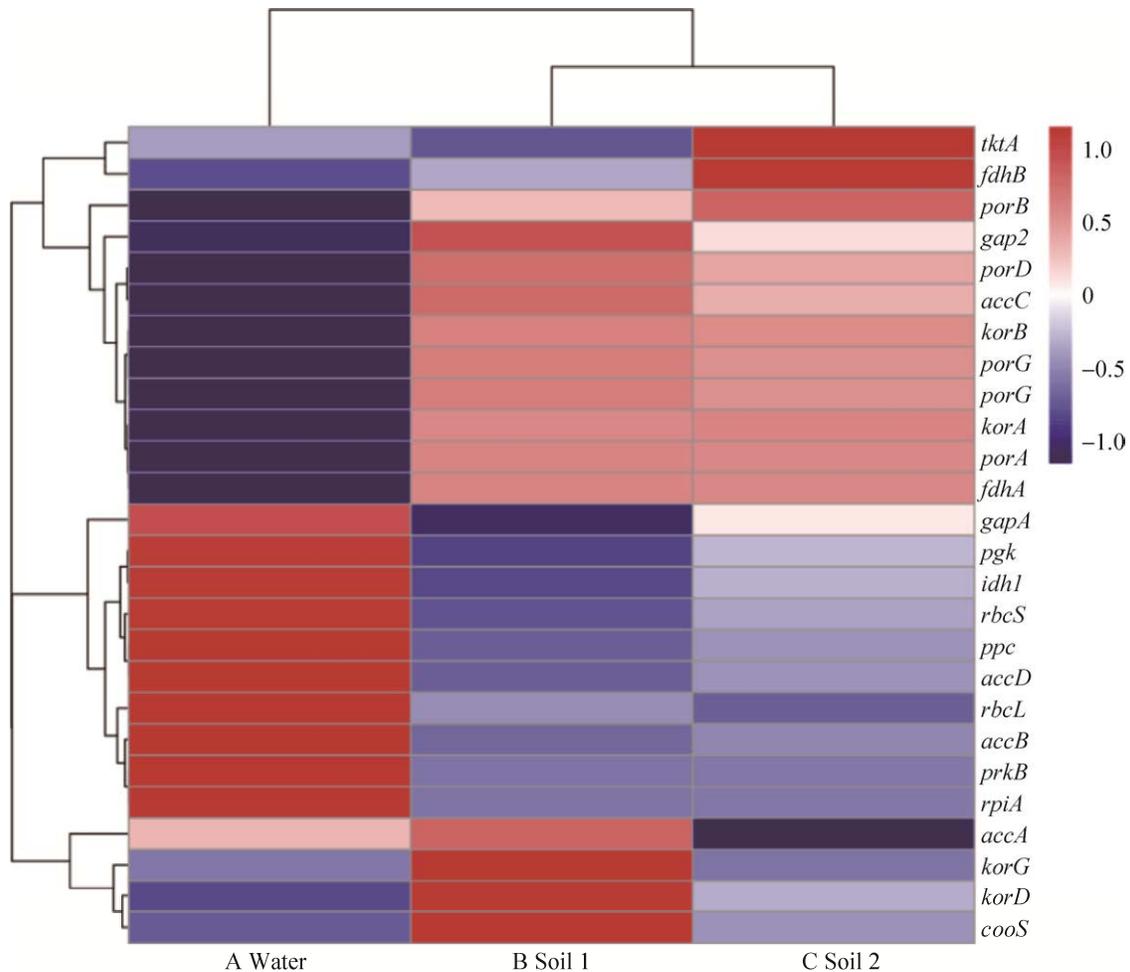


图 5 宏基因组中碳代谢基因丰度热图

Fig. 5 Heat map of carbon metabolism gene abundance in metagenome.

qPCR 等方式对纳帕海高原湿地土壤中 AOA 和 AOB 群落多样性、组成、数量和空间分布进行初步研究^[34], 发现 AOA 主要种群来自奇古菌门 (Thaumarchaeota), AOB 主要种群来自亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 和亚硝化螺菌属 (*Nitrosopira*)。宏基因组数据发现丰富的奇古菌门 (13 181 条序列) 和一些亚硝化单胞菌属 (1 548 条序列)。

根据宏基因组数据中检测到的氮代谢途径基因, 包括硝酸盐同化作用、异化硝酸盐还原、反硝化、固氮和硝化途径, 绘制了纳帕海高原湿地氮循环示意图 (图 7), 并列出了相关过程的基因和参与该过程的微生物。从示意图中可以发现: 整个

纳帕海高原湿地参与硝酸盐还原过程的功能基因占 37.9%, 固氮和氨氧化过程的功能基因占 10.3%, 亚硝酸盐还原和一氧化氮还原的功能基因占 6.8%, 一氧化二氮还原和羟胺氧化过程的功能基因占 3.4%, 古菌和细菌共同维持氮循环的重要过程; 变形菌门、硝化螺旋菌门、疣微菌门、放线菌门、奇古菌门和广古菌门为氮循环的主要贡献者。前期对纳帕海高原湿地细菌及古菌群落的组成研究发现, 土壤样品中存在约 2% 的亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 及 50% 的奇古菌门 (Thaumarchaeota), 分别属于氨氧化细菌和氨氧化古菌, 同时陈伟等的研究发现氮素与微生物群落的多样性显著相关, 由此认为氨氧化微生物在纳

帕海湿地也更为活跃。

从氮代谢基因丰度热图 (图 8) 可以看出水体和土壤中氮代谢途径具有较大差异。水中硝酸盐同化作用基因 (*nasA*)、固氮基因 (*nifD*, *nifK*, *nifH*)、异化硝酸盐还原基因 (*nirB*, *nirD*) 丰度较高; 而土壤则是反硝化基因 (*narH*, *narG*, *norB*) 和硝化基因 (*amoA*, *nxrA*, *nxrB*) 为主; 表明水中以固氮和异化硝酸盐还原过程为主, 土壤中则以反硝化和硝化过程为主。

反硝化作用在氮素循环中是非常重要的一环, 硝酸盐是一种易溶于水的物质, 通过水从土壤流

入水域中富集, 如果没有反硝化作用, 那么硝酸盐将在水中大量积累, 最终会导致水质变坏和地球上氮素循环中断。反硝化作用主要是指细菌将硝酸盐中的氮 (N) 通过一系列的中间产物还原成氮气 (N_2) 的过程。硝酸盐还原成亚硝酸盐是重要的反硝化过程, 可以通过微生物的呼吸作用完成, 这些微生物通常出现在有硝酸盐存在的厌氧环境中比如土壤、海洋沉积物和人的消化道^[44]。反硝化作用具有重要的生态学作用, 如在农业生产中由于好氧性细菌的呼吸作用消耗大量氧气, 造成局部厌氧环境, 土壤中的硝酸盐还原细菌常常就会

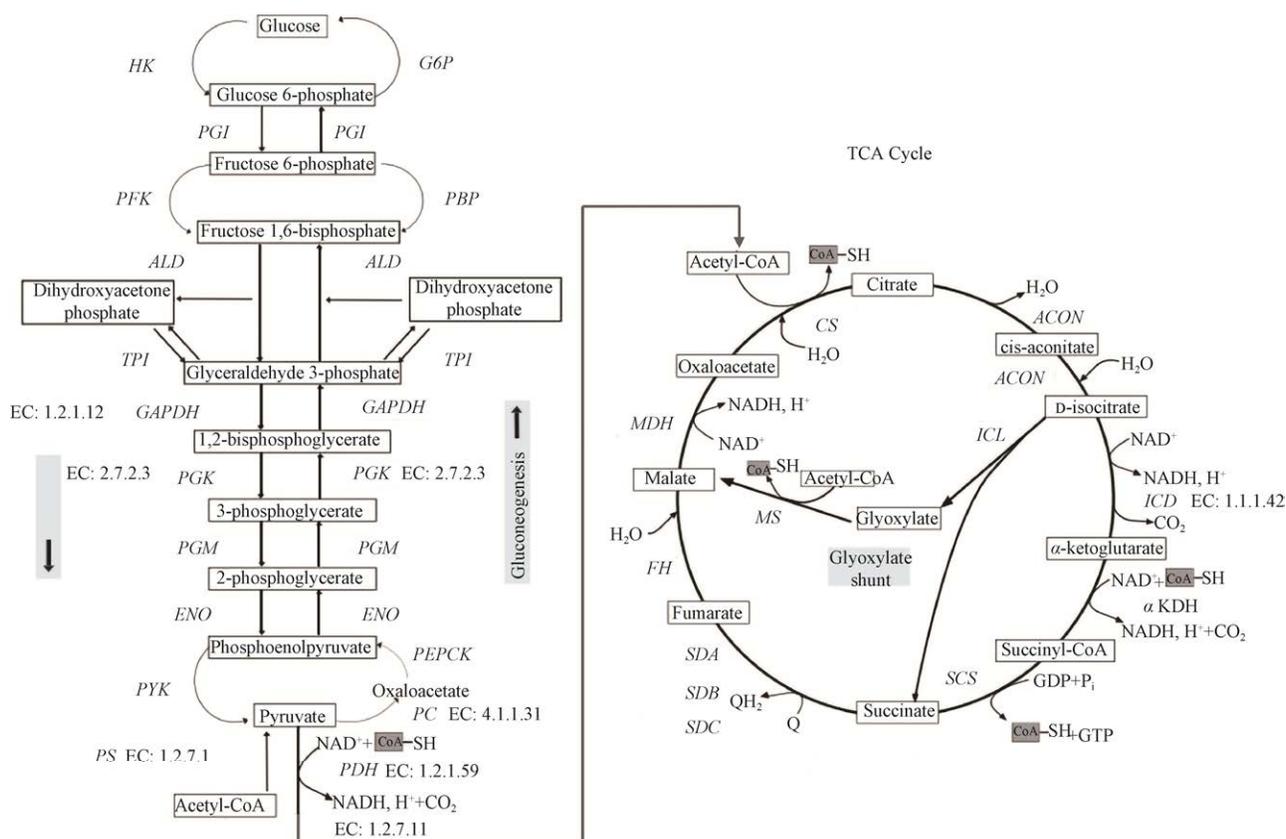


图 6 纳帕海湿地碳循环示意图 (包含糖酵解、糖异生和 TCA 循环途径)

Fig. 6 Carbon cycle of Napahai plateau wetland (including glycolysis, gluconeogenesis and TCA cycle). HK: hexokinase; PGI: phosphoglucoisomerase; PFK: phosphofructokinase; ALD: Aldolase; TPI: triose-phosphate isomerase; G3P: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; PGK: phosphoglycerate kinase; PGM: phosphoglycerate mutase; ENO: enolase; PYK: pyruvate kinase; PEPCK: PEP carboxykinase, FBP: fructose 1,6-bisphosphatase; G6P: glucose 6-phosphatase; PDH: pyruvate dehydrogenase; PC: pyruvate carboxylase; CS: citratesynthase; ACON: aconitase; ICL: isocitratelase; ICD: isocitrate dehydrogenase; α KDH: α -ketoglutarate dehydrogenase; SCS: succinyl-CoA synthetase; SD: succinate dehydrogenase (subunits A, B and C); FH: fumarate hydratase; MS: malate synthase; MDH: malate dehydrogenase.

☎: 010-64807509

✉: cjb@im.ac.cn

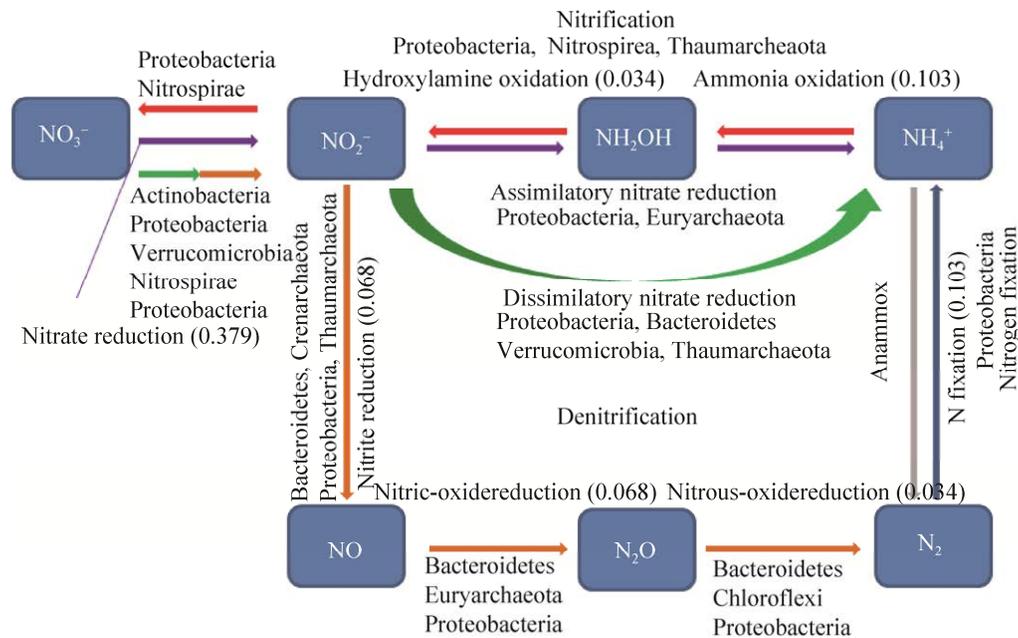


图7 纳帕海高原湿地氮素循环示意图

Fig. 7 Diagram of nitrogen cycle in Napahai plateau wetland. Different colored arrows represent different pathways of nitrogen metabolism, and the abundance of nitrogen metabolism genes associated with this pathway is indicated in parentheses, and the microorganisms involved in this pathway are labeled from the Phylum level.

把农作物能够利用的氮肥（硝酸盐）通过厌氧呼吸代谢掉，造成土壤肥力流失和作物产量下降。因此可以利用土壤中反硝化作用微生物丰度检测纳帕海高原湿地土壤的肥力状况。

基于宏基因组技术的优势，能够直接研究纳帕海高原湿地中微生物的组成、分布以及这些微生物基因组中的功能和代谢基因。通过宏基因组技术获得的纳帕海湿地微生物（包括细菌、真菌、古菌）的丰度和类别分析结果和陈伟等利用16S rRNA基因克隆文库方法得到的微生物多样性结果基本一致^[45]。在微生物分类上，宏基因组的结果在门、纲等分类层级上更多，但是在优势微生物丰度上存在个别差异，推测可能是由于在这段时间内纳帕海高原湿地生态环境遭受到了一定程度的破坏导致。对微生物基因组中功能基因的分析是基于目前已有的功能基因数据库（KEGG、eggNOG）比对，其结果依赖于数据库信息的完整性和全面性。我们发现无论是微生物分类信息还是功能基

因的注释，未分类的信息仍然占有很大一部分比例，这不仅说明纳帕海高原湿地蕴藏丰富的未知的生物资源，同时也反映目前一些主流数据库对于特殊环境的生物信息不匹配的问题。对碳氮循环分析的结果基于碳氮代谢相关基因丰度和微生物丰度信息，根据陈伟等2019年的研究^[37]，对纳帕海高原湿地AOA和AOB的*amoA*基因系统发育分析表明，AOA主要种群来自奇古菌，AOB主要来自亚硝化单胞属和亚硝化螺菌属，这与我们在氮素循环中发现的硝化途径和反硝化途径占比较高的结论一致。综上所述，本研究中的宏基因组分析得出的数据是可靠的。

3 讨论

纳帕海高原湿地蕴藏着丰富的生物多样性，共鉴定出210个门类、3341个属类。细菌域包括184个门，其中变形菌门是最丰富的门，其次是酸杆菌门和放线菌门，纳帕海湿地水体中的变形

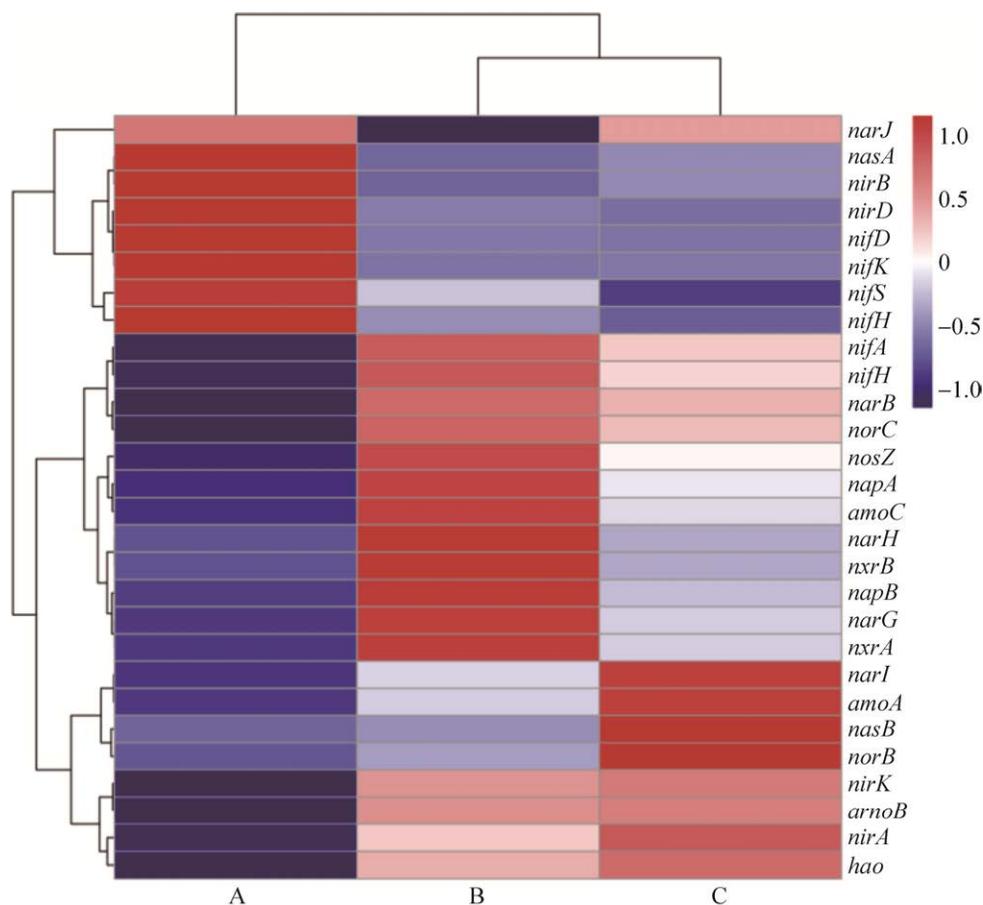


图 8 宏基因组中氮代谢基因丰度热图

Fig. 8 Heat map of nitrogen metabolism gene abundance in metagenome.

菌门和拟杆菌门明显多于土壤,土壤中酸杆菌门、放线菌门、疣微菌门、绿弯菌门、念珠菌门等则高于水体。在 3 262 个细菌属中,土壤中的根瘤菌属占主要优势,水体中的弯曲杆菌属、噬甲基菌属和浮游生物为主要优势属。古菌域鉴定 13 个门、32 个属。真核域鉴定 13 个门、47 个属。通过对宏基因组功能分析显示,最具代表性的基因功能是氨基酸转运和代谢,其次是能源生产和转换功能、辅酶转运和代谢功能、脂质转运和代谢功能、信号转导机制功能。此外,发现碳代谢的基因丰度很高,且湿地中参与氮代谢的微生物丰度较高。在固碳途径上,水中微生物主要以卡尔文循环和 4-羟丁酸双羧酸循环为主;土壤中固碳途径主要是还原性三羧酸循环、3-羟基丙酸循环

☎: 010-64807509

和还原性乙酰 CoA 通路。变形菌门、绿弯菌门、泉古菌门为主要固碳菌群,其中贡献较大的是 α -变形菌纲、 β -变形菌纲、 δ -变形菌纲、绿弯菌纲和热变形菌目。而对于氮循环,水中以固氮和异化硝酸盐还原过程为主,土壤则以反硝化和硝化过程为主,古菌和细菌共同维持氮循环的重要过程,变形菌门、硝化螺旋菌门、疣微菌门、放线菌门、奇古菌门和广古菌门为氮循环的主要贡献者,这些使我们对纳帕海高原湿地氮循环过程有了一个比较完整的认识。

REFERENCES

- [1] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual
- ☎: cjb@im.ac.cn

- microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1): 143-169.
- [2] Rook G, Backhed F, Levin BR, et al. Evolution, human-microbe interactions, and life history plasticity. *Lancet*, 2017, 390(10093): 521-530.
- [3] Wolfe ND, Dunavan CP, Diamond J. Origins of major human infectious diseases. *Nature*, 2007, 447(7142): 279-283.
- [4] Gupta GN, Srivastava S, Khare SK, et al. Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment. *Int J Agric, Environ Biotechnol*, 2014, 7(2): 371-380.
- [5] Rampelotto PH. Resistance of microorganisms to extreme environmental conditions and its contribution to astrobiology. *Sustainability*, 2010, 2(6): 1602-1623.
- [6] Ordoñez OF, Flores MR, Dib JR, et al. Extremophile culture collection from Andean lakes: extreme pristine environments that host a wide diversity of microorganisms with tolerance to UV radiation. *Microb Ecol*, 2009, 58(3): 461-473.
- [7] Leonard E, Nielsen D, Solomon K, et al. Engineering microbes with synthetic biology frameworks. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(12): 674-681.
- [8] Jeong J, Cho N, Jung D, et al. Genome-scale genetic engineering in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(6): 804-810.
- [9] 徐志伟, 魏云林, 季秀玲. 病毒宏基因组学研究进展. *微生物学通报*, 2020, 47(8): 2560-2570.
Xu ZW, Wei YL, Ji XL. Research progress of viral metagenomics. *Microbiology China*, 2020, 47(8): 2560-2570 (in Chinese).
- [10] Schloss PD, Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(3): 303-310.
- [11] Spence PL, Jordan SJ. Effects of nitrogen inputs on freshwater wetland ecosystem services—a Bayesian network analysis. *J Environ Manage*, 2013, 124: 91-99.
- [12] 仇少君, 彭佩钦, 刘强, 等. 土壤微生物生物量氮及其在氮素循环中作用. *生态学杂志*, 2006, 25(4): 443-448.
Qiu SJ, Peng PQ, Liu Q, et al. Soil microbial biomass nitrogen and its role in nitrogen cycling. *Chinese J Ecol*, 2006, 25(4): 443-448 (in Chinese).
- [13] Johnston CA, Groffman P, Breshears DD, et al. Carbon cycling in soil. *Front Ecol Environ*, 2004, 2(10): 522-528.
- [14] Qin JJ, Li RQ, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464(7285): 59-65.
- [15] Hurwitz BL, Deng L, Poulos BT, et al. Evaluation of methods to concentrate and purify ocean virus communities through comparative, replicated metagenomics. *Environ Microbiol*, 2013, 15(5): 1428-1440.
- [16] Thurber RV, Haynes M, Breitbart M, et al. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nat Protoc*, 2009, 4(4): 470-483.
- [17] Mitra S, Rupek P, Richter DC, et al. Functional analysis of metagenomes and metatranscriptomes using SEED and KEGG. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(S1): S21.
- [18] Spain AM, Krumholz LR, Elshahed MS. Abundance, composition, diversity and novelty of soil *Proteobacteria*. *ISME J*, 2009, 3(8): 992-1000.
- [19] Newton RJ, Jones SE, Eiler A, et al. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(1): 14-49.
- [20] Janssen PH. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(3): 1719-1728.
- [21] Polymenakou PN, Bertilsson S, Tselepidis A, et al. Links between geographic location, environmental factors, and microbial community composition in sediments of the Eastern Mediterranean Sea. *Microb Ecol*, 2005, 49(3): 367-378.
- [22] Wang XQ, Wang Q, Guo X, et al. Functional

- genomic analysis of Hawaii marine metagenomes. *Sci Bull*, 2015, 60(3): 348-355.
- [23] Ahn C, Gillevet PM, Sikaroodi M. Molecular characterization of microbial communities in treatment microcosm wetlands as influenced by macrophytes and phosphorus loading. *Ecol Indic*, 2007, 7(4): 852-863.
- [24] Li YL, Wang L, Zhang WQ, et al. The variability of soil microbial community composition of different types of tidal wetland in Chongming Dongtan and its effect on soil microbial respiration. *Ecol Eng*, 2011, 37(9): 1276-1282.
- [25] Johnson SS, Hebsgaard MB, Christensen TR, et al. Ancient bacteria show evidence of DNA repair. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(36): 14401-14405.
- [26] Wu X, Xi WY, Ye WJ, et al. Bacterial community composition of a shallow hypertrophic freshwater lake in China, revealed by 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 61(1): 85-96.
- [27] Chu HY, Fierer N, Lauber CL, et al. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environ Microbiol*, 2010, 12(11): 2998-3006.
- [28] Yergeau E, Hogues H, Whyte LG, et al. The functional potential of high Arctic permafrost revealed by metagenomic sequencing, qPCR and microarray analyses. *ISME J*, 2010, 4(9): 1206-1214.
- [29] Bai Y, Yang DQ, Wang JH, et al. Phylogenetic diversity of culturable bacteria from alpine permafrost in the Tianshan mountains, northwestern China. *Res Microbiol*, 2006, 157(8): 741-751.
- [30] Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 34(4): 415-425.
- [31] Yun JL, Ju YW, Deng YC, et al. Bacterial community structure in two permafrost wetlands on the Tibetan plateau and Sanjiang plain, China. *Microbiol Ecol*, 2014, 68(2): 360-369.
- [32] Huang XL, Hu BQ, Wang P, et al. Microbial diversity in lake—river ecotone of Poyang lake, China. *Environ Earth Sci*, 2016, 75(11): 965.
- [33] Zhou JZ, Xia BC, Treves DS, et al. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(1): 326-334.
- [34] 陈伟, 季秀玲, 李建凯, 等. 纳帕海高原湿地氨氧化微生物群落结构及多样性研究. *昆明理工大学学报(自然科学版)*, 2019, 44(1): 74-84.
Chen W, Ji XL, Li JK, et al. Community and diversity of ammonia oxidation microbial in Napahai plateau wetland. *J Kunming Univ Sci Technol (Nat Sci)*, 2019, 44(1): 74-84 (in Chinese).
- [35] 冯晓远, Perumal V, 王凤平. 宏基因组学分析揭示深古菌 Bathyarchaeota B242 的代谢特征. *微生物学通报*, 2018, 45(1): 11-18.
Feng XY, Perumal V, Wang FP. Metagenomic analysis revealing metabolic characteristics of Bathyarchaeota B242. *Microbiol China*, 2018, 45(1): 11-18 (in Chinese).
- [36] 陆梅, 田昆, 孙向阳, 等. 纳帕海典型湿地土壤真菌群落特征的积水条件和干湿季节变化. *林业科学*, 2018, 54(2): 98-109.
Lu M, Tian K, Sun XY, et al. Variation of soil fungal community characteristics of typical wetland in Napahai between dry wet seasons under different waterlogging conditions. *Sci Sil Sin*, 2018, 54(2): 98-109 (in Chinese).
- [37] 陈伟, 季秀玲, 张琦, 等. 纳帕海高原湿地真菌群落多样性和组成的分布. *微生物学通报*, 2019, 46(3): 494-503.
Chen W, Ji XL, Zhang Q, et al. Diversity and composition of fungal community in Napahai plateau wetlands. *Microbiol China*, 2019, 46(3): 494-503 (in Chinese).
- [38] Pereyra SA, Dill-Macky R. Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae*

- and their contribution to fusarium head blight inoculum. *Plant Dis*, 2008, 92(5): 800-807.
- [39] An JX, Liu C, Wang Q, et al. Soil bacterial community structure in Chinese wetlands. *Geoderma*, 2019, 337: 290-299.
- [40] Gougoulas C, Clark JM, Shaw LJ. The role of soil microbes in the global carbon cycle: tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems. *J Sci Food Agric*, 2014, 94(12): 2362-2371.
- [41] Hügler M, Wirsen CO, Fuchs G, et al. Evidence for autotrophic CO₂ fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle by members of the ϵ subdivision of proteobacteria. *J Bacteriol*, 2005, 187(9): 3020-3027.
- [42] Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(5): 263-276.
- [43] Wang SY, Zhu GB, Zhuang LJ, et al. Anaerobic ammonium oxidation is a major N-sink in aquifer systems around the world. *ISME J*, 2020, 14(1): 151-163.
- [44] Lam P, Kuypers MMM. Microbial nitrogen cycling processes in oxygen minimum zones. *Annu Rev Mar Sci*, 2011, 3: 317-345.
- [45] 陈伟, 季秀玲, 孙策, 等. 纳帕海高原湿地土壤细菌群落多样性初步研究. *中国微生态学杂志*, 2015, 27(10): 1117-1120, 1123.
- Chen W, Ji XL, Sun C, et al. Preliminary study on diversity of bacteria community in Napahai plateau wetland. *Chin J Microecol*, 2015, 27(10): 1117-1120, 1123 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)