

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2017.0088

苏瑜, 王为东. 2017. 我国北方四类土壤中氨氧化古菌和氨氧化细菌的活性及对氨氧化的贡献[J]. 环境科学学报, 37(9): 3519-3527

Su Y, Wang W D. 2017. Activity of AOA and AOB and their contributions to ammonia oxidization in four soils in North China [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 37(9): 3519-3527

我国北方四类土壤中氨氧化古菌和氨氧化细菌的活性及对氨氧化的贡献

苏瑜^{1,2}, 王为东^{1,*}

1. 中国科学院生态环境研究中心, 中国科学院饮用水科学与技术重点实验室, 北京 100085

2. 中国科学院大学, 北京 100049

收稿日期: 2017-01-16

修回日期: 2017-03-12

录用日期: 2017-03-13

摘要: 氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)与氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)是目前已知的两类好氧氨氧化微生物,广泛分布于各类生态系统中.采用双氰胺(dicyandiamide; DCD)和1-辛炔(1-octyne)抑制剂的方法对我国北方湿地、草原、农田、沙漠4类生态系统的土壤中AOA和AOB的氨氧化速率(ammonia oxidation rate, AR)分别进行定量测定,剖析AOA、AOB对不同土壤中氨氧化的贡献.结果表明:在氨氮含量较高的湿地土壤((32.58±1.38) mg·kg⁻¹)中氨氧化速率由AOB主导(AR_{AOB}占AR的86.19%),而在氨氮含量较低的草原土壤((10.40±0.69) mg·kg⁻¹)、农田土壤((5.09±0.25) mg·kg⁻¹)中氨氧化速率则由AOA主导(AR_{AOA}分别占AR的65.50%、62.20%).氨氮含量是影响AOA、AOB相对活性的主要限制性因素.湿地土壤中氨氧化速率最高,为3.22 mg·kg⁻¹·d⁻¹(以N计),其次是草原土壤和农田土壤,其AR分别为1.11、1.00 mg·kg⁻¹·d⁻¹,沙漠土壤中未检测到氨氧化速率.对氨氧化古菌、细菌的*amoA*基因进行定量分析的结果表明:在氨氮含量最高的湿地土壤和最低的沙漠土壤((1.27±0.05) mg·kg⁻¹)中AOA丰度高于AOB丰度,在草原、农田土壤中AOB丰度高于AOA丰度.*amoA*基因生物多样性分析表明,377个古菌*amoA*序列以85%相似度可以划分为19个独立操作单元(operational taxonomic unit, OTU),具有较高的生物多样性,其Shannon指数为1.51~1.73.直接通过氨氧化微生物*amoA*基因丰度来推测AOA、AOB的活性具有一定的缺陷,而依靠AOA、AOB分别的氨氧化速率能够准确地衡量其在不同生态系统中对氨氮去除的相对贡献,对于理解不同生态系统中氨氮去除过程和效应有着重要的意义.

关键词: 氨氧化古菌(AOA); 氨氧化细菌(AOB); 丰度; 氨氧化速率(AR); 1-辛炔

文章编号: 0253-2468(2017)09-3519-09

中图分类号: X172

文献标识码: A

Activity of AOA and AOB and their contributions to ammonia oxidization in four soils in North China

SU Yu^{1,2}, WANG Weidong^{1,*}

1. Key Laboratory of Drinking Water Science and Technology, Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

Received 16 January 2017;

received in revised form 12 March 2017;

accepted 13 March 2017

Abstract: Ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) are two groups of aerobic microorganisms to oxidize ammonia and exist in various ecosystems. Dicyandiamide (DCD) and 1-octyne inhibition methods were exploited to quantify the ammonia oxidation rates (ARs) of AOA and AOB in soils from wetland, grassland, farmland and desert in North China. Results showed that AOB dominated the ammonia oxidation processes in the wetland soil with ammonia N contents of 32.6 mg·kg⁻¹, showing the highest AR_{AOB} of 3.22 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 86.19% of the total AR. AOA also dominated that in the grassland and farmland soils with less ammonia contents of 10.40 and 5.09 mg·kg⁻¹, and AR_{AOA} of the two soils were 65.5% and 62.2% of the total. Ammonia N content was identified as the key factor influencing the relative roles of ammonia oxidation processes by AOA and AOB. AR was not detected in the desert soil with the lowest ammonia contents (1.27 mg·kg⁻¹). The number of archaeal *amoA* genes (genes for potential protein subunit composing the ammonia monooxygenase) was higher than the bacterial *amoA* genes in the wetland soil with the highest ammonia contents. The

基金项目: 国家自然科学基金 (No.51278487)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.51278487)

作者简介: 苏瑜 (1992—), 女, E-mail: suyu14@mails.ucas.ac.cn; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: wdwangh@yahoo.com

Biography: SU Yu (1992—), female, E-mail: suyu14@mails.ucas.ac.cn; * **Corresponding author**, E-mail: wdwangh@yahoo.com

amoA gene biodiversity analysis showed that 377 archaeal *amoA* gene sequences were classified into 19 OTUs at 85% similarity and this suggested a high diversity (Shannon index: 1.51~1.73). It is suggested that it is improper to predict the AR by their abundance alone, and the ammonia oxidation rates can evaluate the relative roles of AOA and AOB in different types of ecosystems. These results help to understand the ammonia removal processes in various ecosystems.

Keywords: ammonia-oxidizing archaea (AOA); ammonia-oxidizing bacteria (AOB); abundance; ammonia oxidation rate (AR); 1-octyne

1 引言 (Introduction)

随着社会经济的快速发展,氮素污染已经成为全球性的、主要的环境污染问题 (Harrington *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2013). 在过去几十年内,人为产生的无机氮污染增加了 120% (Galloway *et al.*, 2008). 正确认识自然界中的氮循环过程是解决氮素污染问题的关键. 氨氧化过程作为硝化过程的第一步亦是其限速步骤,在氮循环中起着关键作用. 长久以来认为,仅氨氧化细菌 (AOB) 具有氧化氨的能力 (Prosser, 1989), 直到 2004 年泉古菌氨单加氧酶 (ammonium monooxygenase, AMO) 编码 *amoA* 基因 (Venter *et al.*, 2004) 的发现改变了这一观点. 2005 年, K6nneke 从海洋中成功分离出第一株自养的氨氧化古菌 *Nitrosopumilus maritimus* (K6nneke *et al.*, 2005). 由此,氨氧化过程得到重新认识. 在过去十几年中,氨氧化古菌 (AOA) 被报道广泛存在于海洋 (Francis *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2010)、土壤 (Leininger *et al.*, 2006; Tourna *et al.*, 2011; Lehtovirta Morley *et al.*, 2016) 以及反应器 (Park *et al.*, 2006) 等环境中. 但与 AOB 相比, AOA 在硝化过程中的相对重要性还存在争议 (Hatzenpichler, 2012).

针对氨氧化微生物在多种生态系统中的作用研究发现, AOA、AOB 在不同生态系统中的作用不同. 在海洋沉积物 (Wuchter *et al.*, 2006) 和土壤 (Leininger *et al.*, 2006) 中, AOA 的丰度是 AOB 的 1~3 倍, 并且氨氮浓度的降低与 AOA 丰度的相关性证明古菌在氨氧化过程中发挥着更重要的作用. 然而, 在河口 (Caffrey *et al.*, 2007) 和沿海沉积物 (Mosier *et al.*, 2008) 中 AOB 的丰度高于 AOA 丰度, AOB 主导氨氧化过程. 范改娜等 (2010) 的研究亦证明在高氮负荷的河流沉积物中, AOB 在氨氧化过程中起主要作用. 生态系统类型的转换可能会对参与氨氧化的土壤微生物产生重要的潜在影响. Chen 等 (2015) 研究了内蒙古典型半干旱生态系统中土地恢复对土壤 AOA、AOB 的丰度及多样性转换的影响, 发现与未采取恢复措施的对照组相比, 退

田还林或退田还草会显著地降低土壤中 AOB 的丰度和氨氧化活性, 恢复前后 AOB 的群落结构组成发生了显著变化, 适应高无机氮浓度的 AOB 种群的丰度显著降低, 退田还草与退田还林措施之间 AOB 的群落差异较小, 与 AOB 相比, 土地恢复对 AOA 的影响很小, 研究得出的结论是: 土地恢复会负面地影响 AOB 的丰度和土壤硝化活性, 并造成硝酸盐氮向地下水中淋溶的潜在效应. 以上研究都是基于通过氨氧化微生物的丰度来代表 AOA、AOB 的活性, 但氨氧化微生物的丰度和活性的关系尚不十分清楚; 而且, 仅仅是氨氧化微生物 *amoA* 基因的存在并不一定能反映 AOA、AOB 氧化氨的能力. Lu 等 (2015) 采用乙炔和 1-辛炔双抑制剂的方法研究了森林土壤中 AOA、AOB 的活性, 探讨了 AOA、AOB 的速率分别对氨氧化过程的贡献及其影响因素, 这对研究 AOA、AOB 在不同类型土壤中对氨氮去除的贡献具有非常重要的指导意义.

鉴于 AOA、AOB 两大类群相对独特的生理学特征、生态学特性, 对不同生境的适应性存在较大差异 (Schleper, 2010; Monteiro *et al.*, 2014), 定量解析在不同生态系统中 AOA、AOB 对氨氧化速率的相对贡献对理解氮循环具有重要的意义. 本文旨在探究 AOA、AOB 在不同生态系统中分别的氨氧化速率及其在硝化过程中的贡献度; 同时甄别影响 AOA、AOB 丰度及活性的主要影响因子. 为了实现这个目标, 采集了包括湿地、草原、农田以及沙漠等不同生态系统的土壤. 通过分子生物学技术对氨氧化微生物进行定性、定量分析, 并通过双氰胺和 1-辛炔抑制剂技术来区分 AOA、AOB 的氨氧化速率, 定量分析 AOA、AOB 在不同的生态系统中对氨氧化过程的贡献, 以期认识氮循环提供理论依据并为治理氮污染问题提供思路.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 样品采集

选取我国北方典型生态系统的土壤开展 AOA、AOB 丰度与活性研究. 样点选择主要考虑生态系统类型、土壤类型、土壤含水率、酸碱性和有机质及养

分物质含量等因素,兼顾纬度、海拔、气候、水文等因素。2016年3月15日、3月17日、3月19日、3月21日采用原位多点混合取样法(composite sampling)分别采集内蒙古自治区包头市赛汗塔拉城中草原芦苇草甸冻土、鄂尔多斯高原库布齐沙漠沙米根际土壤、黑龙江省镜泊湖流域大岗芦苇草甸冻土、河南省南阳鸭河口水库附近农田根际土壤的表层样品,分别记为草原(40°37'17.58"N, 109°54'31.85"E, 海拔 1035 m)、沙漠(40°16'45.78"N, 109°55'54.38"E, 海拔 1091 m)、湿地(44°04'11.77"N, 129°00'06.61"E, 海拔 314 m)、农田(33°14'54.31"N, 112°36'30.53"E, 海拔 165 m)。草原、沙漠、湿地、农田分属 4 个不同的生态系统类型,在实际采样过程中考虑了各生态系统中的代表性植被,并尽可能在无人为扰动的地块进行采样。根据中国气候区划图,草原、沙漠样点隶属于中温带亚干旱大区,湿地样点隶属于中温带湿润大区,农田样点隶属于暖温带亚湿润大区。分别于 4 类土壤采样点内随机选取 3 个以上的均质地块采集土壤表层样品(0~20 cm),多点采集后原地混合样品,除去可见的石块、根系后,贮存于无菌塑封袋中密封,并低温保存带回实验室。部分样品保存于 4 °C 冷库,立即进行理化性质的测定,其余样品放于 -80 °C 保存待提取 DNA。

2.2 理化指标测定

参照《土壤农化分析》(鲍士旦, 2000)中的方法,对土壤中的氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、硝酸盐氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)、全碳(TC)、全氮(TN)进行测定。土壤中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 用 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 溶液浸提,浸提液过滤后用连续流动分析仪(德国, SEAL, AA3)测定;TC、TN 含量由元素分析仪(德国, Elementar 公司)测定;土壤 pH 值由 IQ150 土壤 pH 计原位测得。所有样品均进行 3 次平行测定进行质控。

2.3 DNA 提取和 PCR 扩增

根据操作手册,利用 Fast Soil DNA 提取试剂盒(Qbiogene, Carlsbad, CA)提取 DNA, DNA 于 -20 °C 保存待用。为了保证提取 DNA 的质量,每个样品均提取 3 次 DNA, DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

AOA 扩增采用氨氧化古菌编码氨单加氧酶活性多肽位点基因(*amoA* 基因)的特异引物 *amo*-AF (5'-STAATGCTCTGGCTTAGACG-3') 和 *amo*-AR (5'-GCGCCATCCATCTGTATGT-3') (Francis *et al.*, 2005)。PCR 反应体系为 50 μL , 其中, $10\times$ buffer 5 μL , $2.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 4 μL , $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正反向引物

AF、AR 各 1 μL , BSA 0.25 μL , Taq 酶 0.5 μL , DNA 模板 2 μL , 用 ddH₂O 补足至 50 μL 。PCR 扩增程序由以下 3 步构成:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s, 53 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 30 个循环;75 °C 延伸 15 min。

2.4 克隆文库构建和序列分析

PCR 扩增产物用 Promega Agarose Gel DNA (Promega, Madison, WI) 纯化试剂盒进行切胶纯化,回收的 PCR 产物与 pGEM-Teasy 载体 (Promega, Madison, WI) 连接,转入 JM109 感受态细胞,最后进行蓝白斑筛选。选取 100 个左右白色克隆用通用引物 T7、SP6 进行 PCR 扩增,以鉴定阳性克隆,将阳性克隆进行测序(睿博生物科技有限公司,北京)。返回序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对,并选取参比序列,使用 Clustal_X 程序进行序列对齐,独立操作单元 OTU 利用 DOTUR 软件 (Schloss *et al.*, 2005) 按 85% 的相似度 (Pester *et al.*, 2012) 进行划分,并计算多样性指数 (Shannon 指数)。用 MEGA 5.05 软件以邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树。

2.5 AOA 和 AOB 丰度的测定

采用实时荧光定量 PCR 方法分别对 AOA、AOB 的 *amoA* 基因进行定量分析,其定量 PCR 均采用 SYBR Green 法。AOA 定量采用 AOA 定性分析所用引物 (Francis *et al.*, 2005), AOB 定量选用 *amoA* 功能基因特异引物 *amoA*-1F (5'-GGGTTTC TACTGGTGGT-3') 和 *amoA*-2R (5'-CCCCTCKGSAAG CCTTCTTC-3') (Rotthauwe *et al.*, 1997)。扩增体系如下:SYBRs Premix ExTaq 酶 (TAKARA, 大连) 10 μL , ROX50 0.4 μL , 浓度为 200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AOA、AOB 正反向引物各 0.2 μL , 稀释 10 倍的 DNA 模板 2 μL , 用 ddH₂O 补足至 20 μL 。采用 ABI 7500 实时定量扩增 PCR 仪 (Applied Biosystems, CA, USA) 对 AOA、AOB 进行定量分析。定量 PCR 扩增程序 (Wang *et al.*, 2011):95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 10 s, 53 °C (AOA) 和 55 °C (AOB) 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 40 个循环;72 °C 延伸 1 min。实验设置阴性对照,并将已知拷贝数的质粒 DNA 梯度稀释 (10 倍),得到 6 个标准样品同样进行定量扩增,得到标准曲线,每个样品 3 次平行。要求标线的扩增效率为 95%~105%, R^2 大于 0.98, 标线和样品的溶解曲线为单一峰。

2.6 氨氧化速率测定

氨氧化速率 (AR) 的测定采用双氰胺

(dicyandiamide, DCD) (Zhang *et al.*, 2012) 和 1-辛炔(1-octyne) (Taylor *et al.*, 2013) 抑制技术区分 AOA、AOB 对氨氧化速率的贡献 (AR_{AOA} 和 AR_{AOB})。向 60 mL 血清瓶中加入 5.0 g 自然风干的土壤, 在 37 °C 下培养 9 d。血清瓶中土壤采用 3 种不同处理, 0.42 g(DCD)·kg⁻¹ 土壤用于抑制 AOA 和 AOB 的活性, 2 kPa 的 1-辛炔抑制 AOB 的活性, 最后一种处理不加入任何抑制剂。培养后的 0、3、6 和 9 d 分别取样后用 2 mol·L⁻¹ KCl 浸提, 用流动分析仪测定亚硝酸盐氮(NO_2^- -N) 和 NO_3^- -N 的含量。 $NO_2^- + NO_3^-$ 累积速率(以 N 计)即为氨氧化速率。所有样品设置 3 个重复。

2.7 数据分析

采用国际标准统计分析软件 SAS 9.2 for Windows 进行变量之间的 Pearson 相关性分析, 在未特殊说明的情况下, 统计学上的显著性水平指 $\alpha = 0.05$ (双尾检验)。

3 结果(Results)

3.1 4 类土壤的基本理化性质

湿地、草原、农田和沙漠土壤的基本理化指标差异较大(表 1)。草原(pH=8.30)、沙漠(pH=7.91)土壤呈碱性, 湿地土壤(pH=6.03)为弱酸性, 而农田土壤(pH=4.42)呈极强酸性, 这是由于长期施肥会导致土壤酸性增强。湿地土壤肥沃, 有机质(26.06%±0.08%)、氨氮((32.58±1.38) mg·kg⁻¹) 含量最高, 为高氨氮环境; 沙漠土壤营养贫瘠, 有机质(0.92%±0.01%)、氨氮((1.27±0.05) mg·kg⁻¹) 含量很低; 草原土壤中有机质含量低于农田土壤, 而氨氮含量高于农田土壤。4 类土壤中 TC、TN 的规律与有机质规律相同, 说明 TC、TN 是反映土壤有机营养物质含量的重要指标。农田((1.62±0.24) mg·kg⁻¹)、沙漠((1.66±0.05) mg·kg⁻¹) 土壤的硝酸盐氮含量比湿地((0.53±0.02) mg·kg⁻¹)、草原((0.46±0.03) mg·kg⁻¹) 土壤高一个数量级。因此, 不同土壤中有机质、氨氮等营养物质差异可能会造成 AOA、AOB 分布及对氨氮去除贡献的分异。

表 1 4 类土壤的基本理化指标

Table 1 Physico-chemical indexes of four soils

| 采样点 | pH | 含水率 | 有机质 | TC/ (g·kg ⁻¹) | TN/ (g·kg ⁻¹) | NH ₄ ⁺ -N/ (mg·kg ⁻¹) | NO ₃ ⁻ -N/ (mg·kg ⁻¹) |
|-----|------|--------|--------------|------------------------------|------------------------------|--|--|
| 湿地 | 6.03 | 64.15% | 26.06%±0.08% | 104.8±0.07 | 6.21±0.01 | 32.58±1.38 | 0.53±0.02 |
| 草原 | 8.30 | 11.77% | 1.06%±0.04% | 13.61±0.01 | 0.72±0.02 | 10.40±0.69 | 0.46±0.03 |
| 农田 | 4.42 | 4.88% | 2.28%±0.04% | 17.25±0.01 | 1.39±0.01 | 5.09±0.25 | 1.62±0.24 |
| 沙漠 | 7.91 | 3.95% | 0.92%±0.01% | 8.93±0.02 | 0.35±0.02 | 1.27±0.05 | 1.66±0.05 |

3.2 4 类土壤中氨氧化古菌和氨氧化细菌 *amoA* 基因丰度

采用荧光定量 PCR 技术, 对湿地、草原、农田和沙漠 4 类土壤样品(干土) 进行 AOA 和 AOB 的定量分析, 结果表明 4 类土壤中均检测到了古菌和细菌 *amoA* 基因丰度(图 1)。湿地土壤中氨氧化古菌 *amoA* 基因的丰度最高, 其次是草原、农田土壤, 沙漠中 AOA 的丰度最低; 草原土壤中氨氧化细菌 *amoA* 基因丰度最高, 其次是农田、湿地土壤, 沙漠中 AOB 的丰度最低。在氨氮含量最高的湿地土壤、最低的沙漠土壤中, 古菌 *amoA* 基因丰度大于细菌; 在草原、农田土壤中却呈现与之相反的规律。说明 AOA、AOB 在不同生态系统土壤中的竞争力不同, 而有机质与氨氮含量很低的沙漠土壤中 AOA、AOB 丰度均最低。

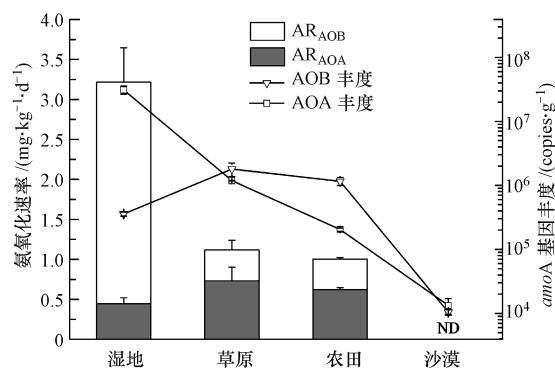


图 1 4 类土壤中古菌、细菌 *amoA* 基因丰度与活性的关系

Fig.1 Relationship between abundance of archaeal and bacterial *amoA* genes and their activities in four soils

氨氧化微生物 *amoA* 基因丰度与理化指标之间的 Pearson 相关性分析结果(表 2)表明, AOA 丰度

与 NH_4^+ 、含水率、有机质、TC、TN 呈显著的正相关,说明营养底物的增加能够显著促进 AOA 的生长增殖.在本研究中,未发现与 AOB 丰度呈显著相关性

的理化指标,说明在所研究的 4 类土壤中理化因子梯度未对 AOB 丰度造成显著影响,也一定程度上反映了 AOB 广谱的生境适应性.

表 2 4 类土壤的理化指标、氨氧化微生物丰度及活性 Pearson 相关系数矩阵

Table 2 Pearson correlation coefficients matrix among physico-chemical indexes, ammonia oxidizers abundance and activity in four soils

| | NH_4^+ | NO_3^- | pH | 含水率 | 有机质 | TC | TN | AOA 丰度 | AOB 丰度 | AR_{AOA} | AR_{AOB} | AR |
|--------------------------|-----------------|-----------------|--------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|--------|--------------------------|--------------------------|----|
| NH_4^+ | 1 | | | | | | | | | | | |
| NO_3^- | -0.729 | 1 | | | | | | | | | | |
| pH | -0.179 | -0.324 | 1 | | | | | | | | | |
| 含水率 | 0.987* | -0.639 | -0.177 | 1 | | | | | | | | |
| 有机质 | 0.962* | -0.524 | -0.283 | 0.990* | 1 | | | | | | | |
| TC | 0.971* | -0.546 | -0.291 | 0.992** | 0.999*** | 1 | | | | | | |
| TN | 0.963* | -0.517 | -0.371 | 0.979* | 0.994** | 0.996** | 1 | | | | | |
| AOA 丰度 | 0.972* | -0.569 | -0.221 | 0.996** | 0.998** | 0.997** | 0.987* | 1 | | | | |
| AOB 丰度 | -0.141 | -0.399 | 0.029 | -0.297 | -0.381 | -0.345 | -0.316 | 0.367 | 1 | | | |
| AR_{AOA} | 0.226 | -0.531 | -0.277 | 0.073 | 0.011 | 0.050 | 0.095 | 0.012 | 0.902 | 1 | | |
| AR_{AOB} | 0.985* | -0.600 | -0.290 | 0.993** | 0.993** | 0.997** | 0.995** | 0.992** | -0.266 | 0.129 | 1 | |
| AR | 0.981* | -0.691 | -0.339 | 0.951* | 0.936 | 0.949 | 0.958* | 0.936 | -0.035 | 0.360 | 0.972* | 1 |

注:粗体数字表示在 $\alpha=0.05$ 水平以上显著; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

3.3 4 类土壤中氨氧化古菌的多样性及群落结构分析

为研究 4 类土壤中 AOA 的生物多样性,对土壤样品进行特异性扩增,并构建古菌 *amoA* 基因的克隆文库.本研究从 4 类土壤中共获得 377 条序列,将这 377 条序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对,结果表明均为氨氧化古菌 *amoA* 基因序列,证明 4 类土壤中均含有氨氧化古菌.用 DOTUR 软件对序列进行多样性分析,在相似度取 85% 时共得到 19 个 OTU,同时计算了微生物多样性 Shannon 指数. Shannon 指数为 1.51~1.73,表明 4 类土壤中 AOA 的多样性较高,并且古菌 *amoA* 基因多样性显示出农田(1.73)>湿地(1.69)>草原(1.62)>沙漠(1.51). 农田土壤能够提供 AOA 生长的生态位,有利于多种 AOA 的繁殖生长;而沙漠土壤由于 NH_4^+ 等营养物质缺乏以及异质性低的原因不利于多种 AOA 的生长.

对 4 类土壤中古菌 *amoA* 基因的 OTU 代表序列和 GenBank 数据库中的相关序列进行比对构建系统发育树(图 2).结果表明 4 类土壤中古菌 *amoA* 基因序列在系统发育树中分成了两大分支,有 17 个

OTU 属于 Group I.1b,有 2 个 OTU 属于 Group I.1a; 湿地、农田、沙漠中所有 AOA 序列均属于 Group I.1b,草原中 AOA 序列在 Group I.1b 和 Group I.1a 中均有分布,但是以 Group I.1b 为主导.为了进一步分析,将 AOA 序列分成 5 个 Clusters(图 2,图 3). Cluster 1 与 *Candidatus Nitrososphaera gargensis* 相近, Cluster 2 与 *Thaumarchaeota* archaeon C13 相近, Cluster 3 与 soil fosmid 54d9 相近, Cluster 4 没有发现与之相近的 AOA 纯培养菌种,推测这一聚群可能存在未分离或培养的区别于已知菌种的另一种 AOA, Cluster 5 与 Group I.1a 相近. Cluster 1~Cluster 4 在湿地土壤中几乎均匀分布,说明湿地中对 AOA 菌种的选择性较小,而草原、农田、荒漠土壤中以 Cluster 2 占主导(60.4%~74.2%),说明 *Thaumarchaeota* archaeon C13 在草原、农田、荒漠土壤中广泛分布并占有绝对优势地位,同时也证明了在草原、农田、荒漠土壤中 AOA 的群落结构类似,而湿地中由于水成土特点及周期性水文变化使得湿地内部存在着频繁的水陆交替特征,从而导致 AOA 种群结构与其他 3 类土壤中的结构显著不同.



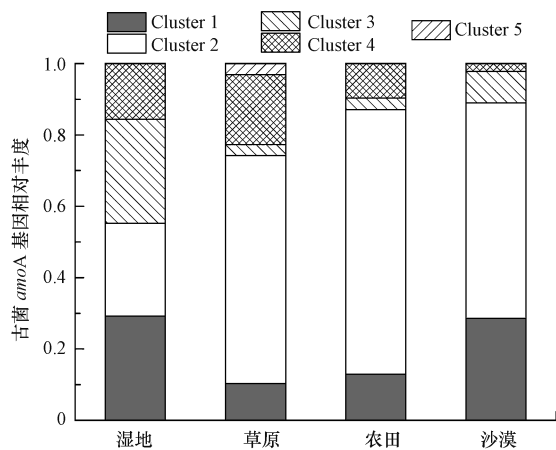
图2 4类土壤中古菌 *amoA* 基因序列的系统发育树(☆.湿地,○.草原,□.农田,△.沙漠)

Fig.2 Phylogenetic tree of archaeal *amoA* gene sequences from four soils (☆. wetland, ○. grassland, □. farmland, △. desert)

3.4 4类土壤中氨氧化古菌和氨氧化细菌的活性

本研究中湿地、草原、农田、沙漠4类土壤的氨氧化速率(AR)中(图1),其中湿地的AR最高,为 $3.22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (以N计),其次是草原、农田土壤,AR分别为 1.11 和 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.在沙漠土壤中虽然检测到了*amoA*基因的丰度,但是未检测到氨氧化微生物的活性.Pearson相关分析结果(表2)表明,AR与古菌和细菌*amoA*基因丰度, AR_{AOA} 与

AOA丰度, AR_{AOB} 与AOB丰度之间分别没有显著的相关关系,这些结果均表明由氨氧化微生物*amoA*基因的丰度不能推测其活性,氨氧化速率能够真正反映不同类型土壤中氧化氨的能力.AOA、AOB分别的氨氧化速率(AR_{AOA} 、 AR_{AOB})能定量地、精确地反映氨氧化古菌、氨氧化细菌氧化氨的能力,在氨氮含量最高($(32.58 \pm 1.38) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)的湿地土壤中氨氧化速率由AOB主导(AR_{AOB} 占AR的86.19%),而

图3 4类土壤中古菌 *amoA* 基因的相对丰度Fig.3 Relative abundance of AOA *amoA* genes in four soils

在氨氮含量相对较低的草原、农田土壤中的氨氧化速率由 AOA 主导 (AR_{AOA} 分别占 AR 的 65.50%、62.20%)。这一研究结果证明,不同类型土壤中对氨氮去除起主导作用的氨氧化微生物不同。推测氨氮含量是影响氨氧化速率主导微生物的一个重要因素:在氨氮含量较高时 AOB 在氨氧化过程中起到的作用比 AOA 大,而在氨氮含量较低时 AOA 主导氨氧化速率。

为了进一步揭示不同土壤中 AOA 和 AOB 在氮循环中的作用,本研究探讨了总氨氧化速率 (AR) 与 AOA、AOB 分别的氨氧化速率 (AR_{AOA} 、 AR_{AOB}) 之间的关系。总氨氧化速率与 AOA、AOB 分别的氨氧化速率的相关性分析结果表明, AR 与 AR_{AOB} 呈显著的正相关 ($r=0.972, p=0.0284$),而 AR 与 AR_{AOA} 无统计学意义上的显著相关性 ($r=0.360, p=0.6395$)。这说明 AOB 对总的氨氧化速率起着决定性的作用。 AR_{AOB} 与 NH_4^+ 、含水率、有机质、TC、TN 呈显著的正相关,营养物质的增加能够提高 AOA 的丰度和 AOB 的活性(表 2)。

3.5 4类土壤中氨氧化古菌和氨氧化细菌的比细胞速率

根据每个 AOA 细胞有 1 个拷贝数的古菌 *amoA* 基因,每个 AOB 细胞有 2.5 个拷贝数的细菌 *amoA* 基因(Jia *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2011),依据 AOA、AOB 的 *amoA* 基因丰度和活性可进一步计算 AOA、AOB 分别的比细胞氨氧化速率。其中湿地土壤中 AOA 的比细胞速率最低,为 $1.02 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,农田土壤中 AOA 的比细胞速率最高,为 $217.61 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,草原土壤中 AOA 的比细胞速率为

$44.20 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。本研究中我国北方 3 种生态系统的土壤 AOA 比细胞速率比南方的洞庭湖沉积物中 AOA 的比细胞速率(周磊榴等, 2013)要高,说明 AOA 在北方湿地、草原、农田中具有较高的活性以及氨氧化潜力。湿地土壤中 AOB 的比细胞速率最高,为 $1388.28 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,这与其较高的 AOB 活性相一致,相比于湿地中 AOB 的比细胞速率,草原、农田土壤 AOB 的比细胞速率较低,分别为 38.26 、 $58.84 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,说明较高的比细胞速率是 AOB 活性高的一个重要条件。这三类土壤的 AOB 比细胞速率均在已报道的纯培养 AOB 菌种的比细胞速率范围内: $21.6 \sim 1992 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Jia *et al.*, 2009)。因此,氨氧化微生物的比细胞速率可以作为评价微生物氨氧化能力的一个指标。

4 讨论(Discussion)

氨氧化古菌的发现改变了人们对传统氮循环中氨氧化过程只由 AOB 来催化完成的认识,以往研究证明 AOA 和 AOB 广泛存在于各种环境中(Zhou *et al.*, 2015),对 AOA、AOB 在不同生态系统中的贡献也有大量研究。但以往的研究中多是通过氨氧化古菌、细菌 *amoA* 基因丰度与硝化速率的相关性分析来衡量 AOA、AOB 对氨氮去除的贡献,例如:Wang 等(2011)对四种氮丰富的湿地的研究中发现,高硝化速率与高 AOB 丰度相一致,认为 AOB 在硝化过程中起主导作用;在湿地沉积物的研究中(Wang *et al.*, 2013),硝化速率与 AOB 的显著相关关系($r=0.873, p=0.002$)说明 AOB 主导硝化过程。用这种方法来研究 AOA、AOB 对氨氮去除的贡献有一定的缺陷,而本文通过双氰胺和 1-辛炔抑制法定量测定了 AOA、AOB 分别的氨氧化速率,为明确氨氧化古菌、细菌的作用提供了依据。

本研究中 3 类土壤的氨氧化速率(沙漠土壤未检测到氨氧化速率)结果表明,氨氮含量较高($32.58 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)的湿地土壤由 AOB 主导氨氧化过程(AR_{AOB} 占总 AR 的 86.19%),而在草原、农田土壤中 AOA 主导氨氧化过程(65.50%、62.20%),这与以往对不同环境中 AOA、AOB 的研究结果相类似:AOA 普遍在低氨氮环境中主导氨氧化过程(Lu *et al.*, 2015; Ouyang *et al.*, 2016),而 AOB 在氮含量较高的湖泊、湿地土壤中起主导作用(Zhou *et al.*, 2016)。氨氧化细菌的 K_s 值($0.01 \sim 0.14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (Taylor *et al.*, 2006)比氨氧化古菌的 K_s 值

($133 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (Martens-Habbena *et al.*, 2009) 大, 氨氧化细菌比古菌更适合在高氨氮浓度下生长, 并且 Hatzenpichler 等 (2008) 也证明了高浓度氨氮 ($3.08 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 会抑制 AOA 氧化氨的能力。因此, 氨氮含量被认为是影响 AOA、AOB 相对活性的主要影响因素。相关性分析结果表明, AR 与 NH_4^+ 呈显著正相关, 以往的研究也证明向土壤中添加氨氮能够增加硝化速率 (Lu *et al.*, 2015), 说明氨氮是影响氨氧化速率的限制性因子。

本研究中 AR 与古菌和细菌 *amoA* 基因丰度都没有显著的相关性, 并且在沙漠土壤中虽然检测到了古菌和细菌 *amoA* 基因丰度, 却没有检测到氨氧化活性, 说明氨氧化微生物的丰度并不能较好代表其氧化氨的能力。本文发现 AR 与 AR_{AOB} 有显著的正相关, 这与 Ouyang 等 (2016) 对农田土壤 4 年的研究结果一致, AOB 的氨氧化速率与总的氨氧化速率更相关, 可以通过控制 AOB 的活性来提高氨氧化速率, 进而提高对氨氮的去除率。

以往的研究中通常认为细菌 *amoA* 基因丰度在高氨氮环境下大于古菌 *amoA* 基因丰度, 而在低氨氮环境中小于古菌 *amoA* 基因丰度 (叶磊等, 2011), 而本文中研究的高氨氮湿地土壤和低氨氮沙漠土壤, AOA 的丰度均高于 AOB 丰度, 说明不同环境中 AOA 与 AOB 的竞争力不同, 并且氨氮可能不是影响 AOA、AOB 相对丰度的唯一因素。本文中所研究的 4 类土壤中 AOA 的丰度与氨氮、含水率、有机质、TC、TN 均呈现显著的正相关, 因此, 以后在研究氨氧化微生物在不同环境中的分布时可以考虑这些环境因子的综合影响。

5 结论 (Conclusions)

1) 在湿地、草原、农田、沙漠 4 类土壤中, 虽然均检测到了氨氧化微生物 *amoA* 基因丰度, 但在沙漠土壤中未检测到氨氧化微生物活性, 说明不能仅用丰度推测其活性。

2) AOA、AOB 分别的氨氧化速率可以更准确地衡量 2 类氨氧化微生物对氨氮去除的能力, 在高氨氮的湿地中, AOB 主导氨氧化过程, 而在草原、农田土壤中则是 AOA 主导氨氧化过程, 氨氮是影响 AOA、AOB 相对活性及氨氧化速率的限制性因子, AR 与 AR_{AOB} 呈显著的正相关。

3) 在湿地、草原、农田、沙漠 4 类土壤中得到了古菌 *amoA* 基因序列, 证明了 AOA 的存在, Shannon

指数表明其具有较高的生物多样性。

致谢: 中国科学院生态环境研究中心祝贵兵研究员对本文的修改提出宝贵建议, 在此表示衷心感谢。在内蒙古自治区、黑龙江省野外采样过程中得到黄维硕士的鼎力相助, 谨致谢忱。

责任作者简介: 王为东 (1973—), 男, 理学博士, 副研究员, 长期从事湿地生态学、湿地生态工程学等领域的研究和实践, 主持和参加与湿地相关的国家级科研项目等 10 余项, 在国内外发表学术论文 50 余篇, 获授权中国发明专利 5 件, 参与撰写专著 3 部。

参考文献 (References):

- 鲍士旦. 2000. 土壤农化分析 [M]. 北京: 中国农业出版社
- Caffrey J M, Bano N, Kalanetra K, *et al.* 2007. Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia [J]. *The ISME Journal*, 1:660-662
- Chen Z, Wu W L, Shao X M, *et al.* 2015. Shifts in abundance and diversity of soil ammonia-oxidizing bacteria and archaea associated with land restoration in a semi-arid ecosystem [J]. *PLOS ONE*, 10 (7):e0132879
- Cui S H, Shi Y L, Groffman P M, *et al.* 2013. Centennial-scale analysis of the creation and fate of reactive nitrogen in China (1910—2010) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (6): 2052-2057
- 范改娜, 祝贵兵, 王雨, 等. 河流湿地氮循环修复过程中的新型功能微生物 [J]. *环境科学学报*, 30(8):1558-1563
- Francis C A, Roberts K J, Beman J M, *et al.* 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(41):14683-14688
- Galloway J N, Townsend A R, Erismann J W, *et al.* 2008. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions [J]. *Science*, 320(5878):889-892
- Harrington R, McInnes R. 2009. Integrated constructed wetlands (ICW) for livestock wastewater management [J]. *Bioresource Technology*, 100(22):5498-5505
- Hatzenpichler R. 2012. Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21):7501-7510
- Hatzenpichler R, Lebedeva E V, Spieck E, *et al.* 2008. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (6): 2134-2139
- Jia Z J, Conrad R. 2009. Bacteria rather than archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil [J]. *Environmental Microbiology*, 11(7):1658-1671
- Könneke M, Bernhard A E, de la Torre J R, *et al.* 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon [J]. *Nature*, 437

- (22):543-546
- Lehtovirta Morley L E, Ross J, Hink L, *et al.* 2016. Isolation of 'Candidatus Nitrosocosmicus franklandus', a novel ureolytic soil archaeal ammonia oxidiser with tolerance to high ammonia concentration [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(5):fiw057
- Leininger S, Urich T, Schloter M, *et al.* 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils [J]. *Nature*, 442(7104):806-809
- Liu X J, Zhang Y, Han W X, *et al.* 2013. Enhanced nitrogen deposition over China [J]. *Nature*, 494(7438):459-462
- Lu X D, Bottomley P J, Myrold D D. 2015. Contributions of ammonia-oxidizing archaea and bacteria to nitrification in Oregon forest soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 85:54-62
- Martens-Habbena W, Berube P M, Urakawa H, *et al.* 2009. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying archaea and bacteria [J]. *Nature*, 461(7266):976-979
- Monteiro M, S eneca J, Magalhães C. 2014. The history of aerobic ammonia oxidizers; from the first discoveries to today [J]. *Journal of Microbiology*, 52(7):537-547
- Mosier A C, Francis C A. 2008. Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary [J]. *Environmental Microbiology*, 10(11):3002-3016
- Ouyang Y, Norton J M, Stark J M, *et al.* 2016. Ammonia-oxidizing bacteria are more responsive than archaea to nitrogen source in an agricultural soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 96:4-15
- Park B J, Park S J, Yoon D N, *et al.* 2010. Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in coculture with sulfur-oxidizing bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22):7575-7587
- Park H D, Wells G F, Bae H, *et al.* 2006. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8):5643-5647
- Pester M, Rattei T, Flechl S, *et al.* 2012. *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic region [J]. *Environmental Microbiology*, 14(2):525-539
- Prosser J I. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria [J]. *Advances in Microbial Physiology*, 30:125-181
- Rothauwe J H, Witzel K P, Liesack W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12):4704-4712
- Schleper C. 2010. Ammonia oxidation; different niches for bacteria and archaea? [J]. *The ISME Journal*, 4:1092-1094
- Schloss P D, Handelsman J. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3):1501-1506
- Taylor A E, Bottomley P J. 2006. Nitrite production by *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira* sp. AV in soils at different solution concentrations of ammonium [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(4):828-836
- Taylor A E, Vajrala N, Giguere A T, *et al.* 2013. Use of aliphatic *n*-alkynes to discriminate soil nitrification activities of ammonia-oxidizing thaumarchaea and bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(21):6544-6551
- Tourna M, Stieglmeier M, Spang A, *et al.* 2011. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20):8420-8425
- Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, *et al.* 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso sea [J]. *Science*, 304(5667):66-74
- Wang C X, Zhu G B, Wang W D, *et al.* 2013. Preliminary study on the distribution of ammonia oxidizers and their contribution to potential ammonia oxidation in the plant-bed/ditch system of a constructed wetland [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 13(9):1626-1635
- Wang S Y, Wang Y, Feng X J, *et al.* 2011. Quantitative analyses of ammonia oxidizing archaea and bacteria in the sediments of four nitrogen-rich wetlands in China [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(2):779-787
- Wuchter C, Abbas B, Coolen M J L, *et al.* 2006. Archaeal nitrification in the ocean [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33):12317-12322
- Xia W W, Zhang C X, Zeng X W, *et al.* 2011. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil [J]. *The ISME Journal*, 5:1226-1236
- 叶磊, 祝贵兵, 王雨, 等. 2011. 白洋淀湖滨湿地岸边带氨氧化古菌与氨氧化细菌的分布特性[J]. *生态学报*, 31(8):2209-2215
- Zhang L M, Hu H W, Shen J P, *et al.* 2012. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils [J]. *The ISME Journal*, 6:1032-1045
- Zhou L L, Wang S Y, Zou Y X, *et al.* 2015. Species, abundance and function of ammonia-oxidizing archaea in inland waters across China [J]. *Scientific Reports*, 5:15969
- 周磊榴, 祝贵兵, 王衫允, 等. 2013. 洞庭湖岸边带沉积物氨氧化古菌的丰度、多样性及对氨氧化的贡献[J]. *环境科学学报*, 33(6):1741-1747
- Zhou X H, Li Y M, Zhang J P, *et al.* 2016. Diversity, abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in riparian sediment of Zhenjiang ancient canal [J]. *Ecological Engineering*, 90:447-458