



抑制剂在氨氧化微生物研究中的应用

杨韦玲, 胡佳杰, 胡宝兰*

浙江大学环境与资源学院环境生态研究所, 浙江 杭州 310058

摘要: 在氨氧化微生物的相关研究中经常使用各类抑制剂, 包括针对硝化作用的抑制剂和针对微生物生长的抑制剂。自发现氨氧化古菌以来, 人们在氨氧化细菌抑制剂的基础上重新筛选和使用不同的抑制剂来满足氨氧化微生物研究的需求。抑制剂既可以加速氨氧化古菌的富集, 也可以帮助研究者区分古菌与细菌对硝化作用的贡献以及它们自身合成代谢能力的差别。本文综述了各类抑制剂的使用浓度和抑制效果, 包括双氰胺(DCD)、3,4-二甲基吡啶磷酸盐(DMPP)、丙烯基硫脲(ATU)等传统抑制剂, 乙炔和辛炔等炔烃类抑制剂, 一氧化氮清除剂以及抗生素等对氨氧化微生物的活性和生长有特异性或通用抑制能力的抑制剂。通过对氨氧化微生物抑制剂的归纳总结, 可为氨氧化微生物研究过程中抑制剂的选择提供参考。

关键词: 硝化抑制剂, 氨氧化细菌, 氨氧化古菌, DCD, 乙炔, PTIO

氨氧化反应指氨氧化微生物催化氨氧化成亚硝酸盐的反应, 它是硝化反应的第一步, 也是限速步骤。自 1890 年发现氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)以来, 人们普遍认为自然界的氨氧化反应都由 AOB 催化完成, 直到 2005 年第一株氨氧化古菌 *Nitrosopumilus maritimus* SCM1^[1] 的分离鉴定, 氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)才逐渐进入人们的视野。氨氧化微生物包括古菌和细菌, 两者在自然界中具有不同的生态位分异^[2-4]。在富集和分离 AOA、探究 AOA 与

AOB 的生态位分异、研究氨氧化反应机理等方面常常会用到不同的抑制剂, 例如乙炔、辛炔、链霉素等。

氨氧化微生物研究中涉及到的抑制剂种类很多, 主要可以分为两大类: 硝化作用抑制剂与生长抑制剂。硝化作用抑制剂指作用于反应过程的抑制剂, 硝化作用抑制剂可以细分为传统硝化作用抑制剂、炔烃类抑制剂和一氧化氮清除剂。而生长抑制剂则是抑制菌体生长和蛋白合成的, 如抑制细菌生长的抗生素。

基金项目: 国家自然科学基金(41773074, 41641031, 51478415); 哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室开放基金(QAK201714); 中央高校基本科研业务费专项资金(2017XZZX010-03)

*通信作者。E-mail: blhu@zju.edu.cn

收稿日期: 2017-12-22; 修回日期: 2018-02-01; 网络出版日期: 2018-03-23

1 硝化作用抑制剂

硝化作用是自然界氮循环的中间环节, 连接固氮过程和反硝化过程。在微生物的作用下氨被氧化成亚硝酸盐, 亚硝酸盐进一步被氧化为硝酸盐。硝化作用使铵态氮不断被氧化, 造成了土壤中氮肥的大量流失, 并且生成的硝酸盐和亚硝酸盐会导致水体污染。 N_2O 是硝化作用的副产物, 其温室效应是 CO_2 的 310 倍, 除此之外 N_2O 还会对臭氧层造成极大的威胁^[5]。因此, 为了减少农业氮肥损失, 提高氮肥利用率, 降低环境污染, 20 世纪以来科学家们就针对硝化作用的抑制进行了大量研究。

虽然 AOB 与 AOA 都能将氨氧化成亚硝酸盐, 但它们的代谢机理有所差异。在 AOB 的氨氧化路径中, 氨先在氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, AMO)的作用下氧化成羟胺, 然后羟胺转移到细胞周质空间, 由羟胺氧还酶(hydroxylamine oxidoreductase, HAO)氧化成亚硝酸。羟胺的氧化会释放 4 个电子, 这 4 个电子由细胞色素 c554 转运给辅酶 Q, 随后 2 个电子传回氨单加氧酶, 用于氨氧化反应的启动, 另外 2 个电子沿着电子链继续转移^[6]。虽然人们至今还没有搞清楚 AOA 的氨氧化途径, 但目前提出的几种代谢机理与 AOB 都相差甚远: 首先, AOA 与 AOB 的 AMO 氨基酸序列相似度很低, 只有 40%左右^[6]; 其次, AOB 中羟胺在 HAO 的作用下氧化成亚硝酸, 但古菌中却并未找到编码 HAO 或其同系物的基因序列^[7]; 第三, 细菌氨氧化反应的中间产物为羟胺, 而对于古菌, 除了羟胺之外, NO 也是氨氧化反应中重要的中间产物^[7-9]。

硝化作用抑制剂作用于反应过程中的酶或中间产物, 从而阻断反应进行。由于古菌与细菌的

氨氧化机理不完全相同, 所以有同时抑制古菌和细菌的硝化作用抑制剂, 也有能分别对古菌或细菌产生特异性抑制作用的抑制剂。

1.1 传统硝化作用抑制剂

20 世纪人们都认为自然界中的氨氧化作用由 AOB 催化完成, 因此传统硝化抑制剂的研究大多针对 AOB。氨氧化过程中起关键作用的酶有 AMO 和 HAO, AMO 将氨氧化成羟胺, HAO 将羟胺氧化成亚硝酸盐。羟胺的积累会对细胞产生毒性, 因此一般不将 HAO 作为抑制剂的作用位点, 而是以 AMO 为抑制剂的作用位点。AMO 是结合在微生物细胞膜上的一种酶, 它可催化的底物超过 60 种^[10], 这些底物都能与 AMO 的活性位点结合并发生反应, 从而对 AMO 氧化氨的过程产生竞争性或非竞争性的抑制。AMO 以 Cu 作为其中心金属元素^[11], 所以 Cu 的螯合剂也会显著抑制 AMO 的活性。根据抑制机理的不同, 研究者们对传统硝化抑制剂作了以下分类^[10,12-13]。

(1) 底物抑制剂, 作为底物与 AMO 结合并发生反应。这一类抑制剂包括竞争性抑制剂和非竞争性抑制剂。竞争性抑制剂即该底物直接作用在 NH_4^+ 与 AMO 的结合位点上, 如甲烷、乙烯和 CO 等; 非竞争性抑制剂则是结合在 AMO 其他的位点上, 如乙烷、丙烷、氯甲烷等。

(2) 金属螯合抑制剂, 与 AMO 的中心金属元素 Cu 结合从而使 AMO 失活。例如, 含硫脲基的化合物作为 Cu 的螯合剂可以抑制 AMO 活性, 而添加 Cu 元素后被抑制的 AMO 活性会逐渐恢复^[14]。这一类抑制剂在研究中较为常用, 包括双氰胺(dicyandiamide, DCD)、3,4-二甲基吡啶磷酸盐(3,4-dimethylpyrazole phosphate, DMPP)、丙烯基硫脲(allylthiourea, ATU)等。

(3) 机理性抑制剂,该抑制剂被催化氧化后的产物具有高活性,并且能与 AMO 共价结合使之失活。机理性抑制作用需要氧气和酶的参与,这种抑制往往具有不可逆的特点,被机理性抑制剂抑制后,微生物氨氧化活性的恢复取决于胞内蛋白的生物合成^[12]。

传统硝化抑制剂已在农业上广泛使用,以减少氮肥流失,关于这一点国内学者也做过总结和归纳^[15-16],使用较多的主要有 DCD、DMPP、ATU 等。这几类抑制剂主要是通过对 Cu 的螯合作用来抑制 AMO 的活性。古菌与细菌的 AMO 酶具有相似性,且中心金属元素都为铜,所以传统硝化抑制剂对 AOA 也有一定的抑制作用,但抑制效果往往比其对 AOB 的抑制效果弱。近年的研究成果表明,传统硝化抑制剂主要用于探究原位土壤中氨氧化微生物的生理和生态特性,抑制强度和使用浓度如表 1 所示。

DCD 是一种白色粉末,为常见的化工原料。研究表明 200–300 mg/L 的 DCD 就能完全抑制 *Nitrosomonas europaea* 的硝化活性^[17],8–10 mg/kg 的 DCD 能有效抑制牧场土壤中 *Nitrosospira* 的生

长和代谢^[18]。DCD 对 AOB 和 AOA 的抑制效果存在争议,在不同研究环境中差别较大。在中性和弱酸性的牧场草地中,氮含量较高,氨氧化作用由 AOB 主导,DCD 能显著抑制 AOB 的生长和 N₂O 的排放,但对 AOA 的抑制作用并不明显^[19-22]。而在强酸性土壤中,DCD 能完全抑制 AOA 的硝化活性,并且古菌的 *amoA* 基因丰度也逐渐降低,但 DCD 对细菌 *amoA* 基因丰度的影响不显著^[4],由此可以推断 DCD 对氨氧化微生物的抑制作用可能受环境 pH 的影响。

DMPP 相对来说是一种比较新的硝化抑制剂,与 DCD 相比,DMPP 具有效率高、用量少、没有生态毒性等优点^[23]。DMPP 与 AMO 结合后对 AOB 的生长以及氨氧化活性都会产生强烈的抑制作用,但对 AOA 的抑制作用却很小^[20],甚至没有^[24]。而 Florio 等^[25]的研究却表明 DMPP 对土壤中 AOB 和 AOA 氨单加氧酶的转录活性都有抑制作用。除了对氨氧化微生物的直接抑制作用外,近几年的研究也开始关注 DMPP 对 N₂ 和 N₂O 排放量的影响,已有研究表明 DMPP 能有效减少牧场土壤中 N₂O 和 N₂ 的排放^[26]。

表 1. 传统硝化抑制剂对 AOA 和 AOB 的抑制效果

Table 1. Strength of inhibition of traditional nitrification inhibitors on AOA and AOB

Inhibitor	Concentration	AOA	AOB	Reference
DCD	10 kg/hm ²	+	++	Di and Cameron, 2011
	50 mg/kg	++	+	Zhang et al., 2012
	0–1500 μmol/L	+	++	Shen et al., 2013
DMPP	10 kg/hm ²	+	++	Di and Cameron, 2011
	1.94 kg/hm ²	–	++	Kleineidam et al., 2011
ATU	100 μmol/L	+	++	Hatzenpichler et al., 2008
	100 μmol/L	+	++	Taylor et al., 2010
	0.1–500 μmol/L	+	++	Shen et al., 2013
	20 μmol/L	–	++	Jung et al., 2014
	10 μmol/L	+	++	Sauder et al., 2017

++ significant inhibition; + low inhibition; – no inhibition.

丙烯基硫脲(ATU)也是通过对 Cu 的螯合作用来抑制 AMO 的活性, 100 $\mu\text{mol/L}$ 以内的 ATU 就能完全抑制 AOB 的活性^[14,27-28], 但同样浓度的 ATU 却不能完全抑制古菌 *Nitrososphaera gargensi*^[29]。Sauder 等^[30]在古菌 *Nitrosocosmicus exaquare* 的富集物中加入了 10 $\mu\text{mol/L}$ ATU, 发现富集物的氨氧化活性并没有被抑制, 说明低浓度的 ATU 对 AOA 的抑制作用较弱, 利用这一特性可以使用低浓度的 ATU 作为 AOB 的特异性抑制剂。

Shen 等^[8]比较了 DCD 和 ATU 对氨氧化细菌 *Nitrosospira multiformis* 和氨氧化古菌 *Nitrososphaera viennensis* EN76 的抑制作用, 结果发现 DCD 和 ATU 对细菌和古菌都有抑制作用, 但是对古菌 *N. viennensis* 的抑制作用要弱得多, ATU 对 *N. viennensis* 的半抑制浓度是 *N. multiformis* 的 1000 倍。

总的来说, 传统硝化抑制剂对 AOB 的抑制作用强于 AOA, 尤其是低浓度的 ATU 对 AOA 几乎没有抑制作用, 在试验中可以被用作 AOB 的特异性抑制剂。另外, 关注传统硝化抑制剂对温室气体 N_2O 排放量的影响也是目前的一个研究热点。

1.2 炔烃类抑制剂

炔烃类抑制剂对氨氧化微生物都有一定的抑制作用, 不论碳链长短, 所有炔烃几乎都能完全抑制细菌 *Nitrosomonas europaea* 的氨氧化代谢, 碳链长度 2-5 的炔烃也能完全抑制古菌 *N. maritimus* 的氨氧化。其中, 乙炔常被用作 AOA 和 AOB 的通用抑制剂。

在氨氧化微生物的研究中, 乙炔的使用由来已久。1978 年 Hynes 等^[31]发现乙炔能抑制 *N. europaea* 纯培物中氨氮的氧化, 随后乙炔逐渐被用作土壤硝化作用的有效抑制剂^[32]。乙炔是机理性抑制剂, 它被氧化后会生成不饱和的环氧化合

物, 该环氧化物具有高活性, 能与 AMO 共价结合, 使 AMO 发生不可逆的失活, 失活后氨氧化活性的恢复取决于新的氨单加氧酶的合成, 也就是取决于氨氧化微生物的生物合成作用^[12-13,33]。低浓度的乙炔(≥ 1 Pa)就对 *N. europaea* 的氨氧化有 100% 的抑制效果。

当碳链长度超过 6 时, 炔烃对古菌的抑制作用就逐渐减弱, 尤其是辛炔, 对 AOB 有很强的抑制作用, 但对 AOA 的抑制作用很弱, 甚至没有。实验证明浓度低于 20 $\mu\text{mol/L}$ 的辛炔能特异性抑制氨氧化细菌 *N. europaea*, 对古菌 *N. maritimus* 的活性没有影响^[34]。与 *N. maritimus* 相同, 另外两株古菌 *N. viennensis* 和 *N. gargensis* 对碳链长度小于 5 的炔烃非常敏感, 但是对碳链较长的炔烃却表现出很强的耐受性。在浓度低于 20 $\mu\text{mol/L}$ 的辛炔的作用下, 古菌 *N. viennensis* 和 *N. gargensis* 的活性都不会受影响^[35]。

乙炔能同时抑制 AOA 和 AOB 的氨氧化活性, 而 20 $\mu\text{mol/L}$ 以下辛炔只能特异性抑制 AOB, 研究者们常利用这一特性来研究 AOA 和 AOB 的对硝化活性的相对贡献。Taylor 等^[36]用 4 $\mu\text{mol/L}$ 辛炔区分 AOA 和 AOB 的硝化活性, 以添加乙炔的悬浮土样作为对照组, 分别得到了 AOA 和 AOB 硝化潜能随温度变化的关系, 对比了 AOA 和 AOB 热力学特性的不同。Yang 等^[37]也用相同的方法, 研究了 AOA 和 AOB 的硝化活性与氨氮浓度和温度的关系。Hink 等^[38]用辛炔区分 AOA 和 AOB 硝化活性以及产生的 N_2O 的量, 添加乙炔抑制全部的氨氧化活性作为对照, 得出当氨含量与施肥量一致时, 实验土样中氨氧化活性和 N_2O 的产生都由 AOB 主导, 在相同条件下 AOA 产生的 N_2O 低于 AOB。炔烃类抑制剂在试验研究中的应用如表 2 所示。

表 2. 炔烃类抑制剂对 AOA 和 AOB 的抑制效果
Table 2. Strength of inhibition of alkyne inhibitors on AOA and AOB

Inhibitor	Concentration	AOA	AOB	Reference
Acetylene	8 $\mu\text{mol/L}$	++	++	Taylor et al., 2010
	0.01% V/V	++	++	Lehtovirta-Morley et al., 2011
	0.01% V/V	++	++	Hink et al., 2016
	6 $\mu\text{mol/L}$	++	++	Sauder et al., 2017
	10 $\mu\text{mol/L}$	++	++	Taylor et al., 2017
	6 $\mu\text{mol/L}$	++	++	Yang et al., 2017
1-Octyne	20 $\mu\text{mol/L}$	-	++	Taylor et al., 2013
	20 $\mu\text{mol/L}$	+	++	Taylor et al., 2015
	0.03% V/V	-	++	Hink et al., 2016
	8 $\mu\text{mol/L}$	-	++	Sauder et al., 2017
	4 $\mu\text{mol/L}$	-	++	Taylor et al., 2017
	4 $\mu\text{mol/L}$	-	++	Yang et al., 2017

++ significant inhibition; + low inhibition; - no inhibition.

1.3 一氧化氮(NO)清除剂

PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide)是一种一氧化氮清除剂,在医药研究领域使用广泛^[39-40],PTIO 或者羧基 PTIO (carboxy-PTIO)会跟 NO 发生反应,生成 NO_2^- 和 PTIs,根据稳态 NO 浓度的不同, NO_2^- 与 PTIs 浓度之比介于 1 到 2 之间^[41]。

AOB 的氨氧化代谢途径已经很清晰,但 AOA 的代谢途径还未完全探明。Walker 等^[42]曾提出 AOA 与 AOB 的氨氧化路径不同,并推测 NO 是 AOA 氨氧化过程的一种中间产物。因此,研究者们认为一氧化氮清除剂会对 AOA 的氨氧化过程产生抑制作用,但不会对 AOB 产生影响,众多的研究也证实了这一观点。Shen 等^[8]对比了多种硝化抑制剂对 AOA (*N. viennensis* EN76)和 AOB (*N. multiformis*)的作用效果,其中,只有羧基 PTIO 对 AOA 有很强的抑制作用,且不会对 AOB 产生影响。PTIO 对古菌 *N. viennensis* 半抑制浓度为 $(18.3 \pm 5.2) \mu\text{mol/L}$,完全抑制浓度为 $52 \mu\text{mol/L}$,

然而 $200 \mu\text{mol/L}$ 的 PTIO 对 AOB 也没有任何抑制效果。Jung 等^[43]为了探究 NO 在 AOA 氨氧化过程中的作用,向培养基中添加了 PTIO,结果发现在 $100 \mu\text{mol/L}$ PTIO 的作用下,AOA 的生长和活性被完全抑制。Martens 等^[9]的研究证实了 2 株海洋型 AOA(SCM1 和 HCA1)的代谢过程会产生中间产物 NO,并且 SCM1 和 HCA1 的氨氧化作用在添加 $100 \mu\text{mol/L}$ PTIO 的条件下被完全抑制,而 $100 \mu\text{mol/L}$ 的 PTIO 对 AOB 没有产生抑制作用。

PTIO 对 AOA 的抑制效果显著,且不会影响 AOB 的代谢,因此在氨氧化微生物的相关研究中,PTIO 常常被用作 AOA 的特异性抑制剂,用于区分环境样品或混合培养物中 AOA、AOB 对硝化作用的相对贡献。例如, Yan 等^[44]向混合培养物中添加了 $200 \mu\text{mol/L}$ PTIO 用于特异性抑制海洋 AOA *N. maritimus*,发现 40%–60%的氨氧化反应是由 *N. maritimus* 催化的。PTIO 在不同试验中的使用浓度和抑制效果如表 3 所示。

表 3. PTIO 对 AOA 和 AOB 的抑制效果

Table 3. Strength of inhibition of PTIO on AOA and AOB

Concentration/ ($\mu\text{mol/L}$)	AOA	AOB	Reference
200	++	-	Yan et al., 2012
50	++	-	Shen et al., 2013
100	++	-	Jung et al., 2014
100	++	-	Martens-Habbena et al., 2015
100	++	-	Sauder et al., 2016
150	++	-	Kozlowski et al., 2016
200, 400	++	-	Sauder et al., 2017

++: significant inhibition; +: low inhibition; -: no inhibition.

除了 PTIO 之外, 其他几种 NO 清除剂也被证实对 AOA 有特异性抑制作用^[45]。咖啡酸、姜黄素、亚甲基蓝和奎诺二甲基丙烯酸酯对 AOA (*N. maritimus*) 和 AOB (*N. europaea*) 的抑制作用不同, 能在较低浓度下对 AOA 产生抑制作用, 且抑制强度远远大于 AOB。尤其是 100 $\mu\text{mol/L}$ 的咖啡酸和 3 $\mu\text{mol/L}$ 的亚甲基蓝, 都能对 AOA 产生 100% 的抑制作用, 与 100 $\mu\text{mol/L}$ PTIO 的抑制作用相当。目前, 一氧化氮清除剂是唯一一类可以特异性抑制 AOA 的抑制剂, 在今后的研究中肯定会有更多的应用。

2 生长抑制剂

另一类常用的抑制剂为生长抑制剂, 主要包括各类抗生素。通常情况下, 对细菌有抑制作用的抗生素对古菌都没有影响, 比如 *N. viennensis* 对链霉素、卡那霉素、羧苄青霉素和氨苄青霉素都不敏感^[46]。氨氧化微生物研究中常用的抗生素包括链霉素、青霉素、卡那霉素、庆大霉素和奇霉素等。抗生素主要用于古菌的富集过程, 例如在 *Nitrosotalea devanaterria* 的富集过程中,

Lehtovirta 等^[47]在培养基中加入了 50 mg/L 链霉素用于抑制细菌的生长。并且她还使用同样的方法获得了 *Nitrosocosmicus franklandus* 的纯培养物^[48]。而在另一株氨氧化古菌 *N. viennensis* 的富集和分离过程中, Tourna 等^[46]使用链霉素、卡那霉素和氨苄青霉素作为常规添加剂, 最终获得了 2 个富集物 EN76 和 EN123。Chen 等^[49]在 AOA 的富集过程中使用了 7 种抗生素, 形成 7 种不同的组合, 结果发现同时使用链霉素、卡那霉素、氨苄青霉素、羧苄青霉素和四环素时效果最好, 得到的 AOA 富集程度最高, 达 41.23%。Kozlowski 等^[7]在探究 *N. viennensis* 的氨氧化机理时也使用了羧苄青霉素来保证菌株的纯度。

除此之外, 抗生素也能用于区分古菌与细菌的蛋白合成能力, 例如在生理实验中, Taylor 等^[36]为了区分不同温度下 AOA 和 AOB 的生物合成潜能, 使用了卡那霉素和壮观霉素来抑制细菌蛋白的合成。抗生素在氨氧化古菌的相关研究中使用十分普遍, 对古菌的富集分离和生理探究都有重要的作用。

3 小结和展望

在氨氧化微生物的研究中, 使用抑制剂是一种非常有效的研究手段, 既可以加速氨氧化古菌的富集, 也可以帮助我们区分古菌与细菌对硝化作用的贡献以及它们自身的合成代谢能力。在实验室的机理性研究中, 乙炔、辛炔和 PTIO 常被用来区分 AOA、AOB 对硝化作用的贡献, 而传统硝化抑制剂则主要用于农田土壤的原位研究。生长抑制剂主要是抗生素, 在 AOA 的富集和分离等实验中, 抗生素常被用来抑制细菌的生长, 促进古菌富集, 在 AOA 的机理性探究实验中, 抗生素也

用于维持古菌的高纯度。

N_2O 是一种重要的温室气体,而土壤中的硝化反应是产生 N_2O 的重要源头。因此,近年来,传统硝化抑制剂在控制土壤 N_2O 排放上的应用也受到了广泛关注。在牧场土壤中加入 DCD 或 DMPP 等硝化作用抑制剂后,氨氧化微生物,尤其是 AOB 被显著抑制,从而有效减少了牧场生态系统 N_2O 气体的排放量^[22]。但研究者们对 AOA 和 AOB 产生 N_2O 气体的不同机制还所知甚少,抑制剂对 N_2O 的抑制机理也尚未明晰。另外,研究者们普遍认为 NO 是 AOA 氨氧化反应的中间产物, AOB 的氨氧化过程则只有羟胺作为中间产物,因此常常用一氧化氮清除剂 PTIO 来区分 AOA 和 AOB 对硝化作用的贡献,并且也取得了理想的实验结果。但 Caranto 等^[50]却对此提出了挑战,他们的研究表明 NO 也是 AOB 氨氧化过程中不可或缺的中间产物,这与之前众多有关 PTIO 的试验结果相矛盾。AOA 的代谢路径还有待探究,并且氨单加氧酶的具体化学结构也尚未有报道。很多抑制剂对 AOA 和 AOB 都有不同的作用效果,但具体原因,以及古菌和细菌氨单加氧酶的结构差异至今还没有科学的论断。因此,今后还需结合各种分子生物学的手段,在氨氧化反应机理及抑制剂作用机理方面进行深入探究。

除了 AOA 和 AOB 之外,全程硝化菌(complete ammonia oxidizing, comammox)也能好氧化铵态氮^[51],因此在不同的生境中 comammox 也会参与竞争,与 AOA 和 AOB 形成不同的生态位分异。目前,comammox 的研究尚处于起步阶段,对其生理特性的研究主要依靠分子生物学手段,尚没有抑制剂能区分生境中的 comammox 与 AOA、AOB,因此在这方面也需要投入更多的研究。

在农业上,要关注环境因素对抑制剂抑制效

果的影响,因地制宜地选择合适的抑制剂,以减少氮肥流失和污染物质的生成。并且在研究现有抑制剂的同时,还需要开发新型高效的抑制剂以适应不同土壤、不同环境及实验室研究的需求。

参考文献

- [1] Könneke M, Bernhard AE, de la Torre Jr, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437(7058): 543–546.
- [2] Gubry-Rangin C, Nicol GW, Prosser JI. Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 74(3): 566–574.
- [3] Hatzenpichler R. Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(21): 7501–7510.
- [4] Zhang LM, Hu HW, Shen JP, He JZ. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *The ISME Journal*, 2012, 6(5): 1032–1045.
- [5] Ravishankara AR, Daniel JS, Portmann RW. Nitrous oxide (N_2O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science*, 2009, 326(5949): 123–125.
- [6] Stahl DA, de la Torre JR. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66(1): 83–101.
- [7] Kozłowski JA, Stieglmeier M, Schleper C, Klotz MG, Stein LY. Pathways and key intermediates required for obligate aerobic ammonia-dependent chemolithotrophy in bacteria and thaumarchaeota. *The ISME Journal*, 2016, 10(8): 1836–1845.
- [8] Shen TL, Stieglmeier M, Dai JL, Urich T, Schleper C. Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospira multififormis* to nitrification inhibitors. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 344(2): 121–129.
- [9] Martens-Habbena W, Qin W, Horak REA, Urakawa H, Schauer AJ, Moffett JW, Armbrust EV, Ingalls AE, Devol AH, Stahl DA. The production of nitric oxide by marine ammonia-oxidizing archaea and inhibition of archaeal ammonia oxidation by a nitric oxide scavenger. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(7): 2261–2274.
- [10] Subbarao GV, Ito O, Sahrawat KL, Berry WL, Nakahara K, Ishikawa T, Watanabe T, Suenaga K, Rondon M, Rao IM. Scope and strategies for regulation of nitrification in

- agricultural systems-challenges and opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2006, 25(4): 303–335.
- [11] Arp DJ, Sayavedra-Soto LA, Hommes NG. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Archives of Microbiology*, 2002, 178(4): 250–255.
- [12] Ruser R, Schulz R. The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide (N₂O) release from agricultural soils—a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2015, 178(2): 171–188.
- [13] McCarty GW. Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29(1): 1–9.
- [14] Hooper AB, Terry KR. Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *Journal of Bacteriology*, 1973, 115(2): 480–485.
- [15] Huang YZ, Feng ZW, Wang XK, Zhang FZ. Research progress of nitrification inhibitors applied in agriculture. *Chinese Journal of Soil Science*, 2002, 33(4): 310–315. (in Chinese)
黄益宗, 冯宗炜, 王效科, 张福珠. 硝化抑制剂在农业上应用的研究进展. *土壤通报*, 2002, 33(4): 310–315.
- [16] Sun ZM, Wu ZJ, Chen LJ, Ma XZ. Application effect, affecting factors, and evaluation of nitrification inhibitor: A review. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(7): 1611–1618. (in Chinese)
孙志梅, 武志杰, 陈利军, 马星竹. 硝化抑制剂的施用效果、影响因素及其评价. *应用生态学报*, 2008, 19(7): 1611–1618.
- [17] Amberger A. Research on dicyandiamide as a nitrification inhibitor and future outlook. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1989, 20(19/20): 1933–1955.
- [18] Di HJ, Cameron KC. Effects of temperature and application rate of a nitrification inhibitor, dicyandiamide (DCD), on nitrification rate and microbial biomass in a grazed pasture soil. *Australian Journal of Soil Research*, 2005, 42(8): 927–932.
- [19] Di HJ, Cameron KC, Shen JP, Winefield CS, O’Callaghan M, Bowatte S, He JZ. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72(3): 386–394.
- [20] Di HJ, Cameron KC. Inhibition of ammonium oxidation by a liquid formulation of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) compared with a dicyandiamide (DCD) solution in six New Zealand grazed grassland soils. *Journal of Soils and Sediments*, 2011, 11(6): 1032–1039.
- [21] Dai Y, Di HJ, Cameron KC, He JZ. Effects of nitrogen application rate and a nitrification inhibitor dicyandiamide on ammonia oxidizers and N₂O emissions in a grazed pasture soil. *Science of the Total Environment*, 2013, 465: 125–135.
- [22] Di HJ, Cameron KC, Podolyan A, Robinson A. Effect of soil moisture status and a nitrification inhibitor, dicyandiamide, on ammonia oxidizer and denitrifier growth and nitrous oxide emissions in a grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 73: 59–68.
- [23] Zerulla W, Barth T, Dressel J, Erhardt K, von Locquenghien KH, Pasda G, Rädle M, Wissemeier AH. 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP)—a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 34(2): 79–84.
- [24] Kleineidam K, Košmrlj K, Kublik S, Palmer I, Pfab H, Ruser R, Fiedler S, Schloter M. Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rhizosphere and bulk soil. *Chemosphere*, 2011, 84(1): 182–186.
- [25] Florio A, Clark IM, Hirsch PR, Jhurreea D, Benedetti A. Effects of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on abundance and activity of ammonia oxidizers in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, 50(5): 795–807.
- [26] Friedl J, Scheer C, Rowlings DW, Mumford MT, Grace PR. The nitrification inhibitor DMPP (3,4-dimethylpyrazole phosphate) reduces N₂ emissions from intensively managed pastures in subtropical Australia. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 108: 55–64.
- [27] Ginestet P, Audic JM, Urbain V, Block JC. Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(6): 2266–2268.
- [28] Adamczyk J, Hesselsoe M, Iversen N, Horn M, Lehner A, Nielsen PH, Schloter M, Roslev P, Wagner M. The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6875–6887.
- [29] Hatzenpichler R, Lebedeva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(6): 2134–2139.
- [30] Sauder LA, Albertsen M, Engel K, Schwarz J, Nielsen PH, Wagner M, Neufeld JD. Cultivation and characterization of *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*, an ammonia-oxidizing archaeon from a municipal wastewater treatment system. *The ISME Journal*, 2017, 11(5): 1142–1157.
- [31] Hynes RK, Knowles R. Inhibition by acetylene of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiology Letters*, 1978, 4(6): 319–321.

- [32] Hyman MR, Wood PM. Suicidal inactivation and labelling of ammonia mono-oxygenase by acetylene. *The Biochemical Journal*, 1985, 227(3): 719–725.
- [33] Qiao CL, Liu LL, Hu SJ, Compton JE, Greaver TL, Li QL. How inhibiting nitrification affects nitrogen cycle and reduces environmental impacts of anthropogenic nitrogen input. *Global Change Biology*, 2015, 21(3): 1249–1257.
- [34] Taylor AE, Vajjala N, Giguere AT, Gitelman AI, Arp DJ, Myrold DD, Sayavedra-Soto L, Bottomley PJ. Use of aliphatic *n*-alkynes to discriminate soil nitrification activities of ammonia-oxidizing thaumarchaea and bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(21): 6544–6551.
- [35] Taylor AE, Taylor K, Tennigkeit B, Palatinszky M, Stieglmeier M, Myrold DD, Schleper C, Wagner M, Bottomley PJ. Inhibitory effects of C₂ to C₁₀ 1-alkynes on ammonia oxidation in two *Nitrososphaera* species. *Applied & Environmental Microbiology*, 2015, 81(6): 1942–1948.
- [36] Taylor AE, Giguere AT, Zobelein CM, Myrold DD, Bottomley PJ. Modeling of soil nitrification responses to temperature reveals thermodynamic differences between ammonia-oxidizing activity of archaea and bacteria. *The ISME Journal*, 2016, 11(4): 896–908.
- [37] Yang O, Norton JM, Stark JM. Ammonium availability and temperature control contributions of ammonia oxidizing bacteria and archaea to nitrification in an agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 113: 161–172.
- [38] Hink L, Nicol GW, Prosser JI. Archaea produce lower yields of N₂O than bacteria during aerobic ammonia oxidation in soil. *Environmental Microbiology*, 2016, 19(12): 4829–4837.
- [39] Amano F, Noda T. Improved detection of nitric oxide radical (NO•) production in an activated macrophage culture with a radical scavenger, carboxy PTIO and Griess reagent. *FEBS Letters*, 1995, 368(3): 425–428.
- [40] Akaike T, Maeda H. Quantitation of nitric oxide using 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl 3-oxide (PTIO). *Methods in Enzymology*, 1996, 268: 211–221.
- [41] Goldstein S, Russo A, Samuni A. Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with NO, NO₂, and O₂⁻. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(51): 50949–50955.
- [42] Walker CB, de la Torre JR, Klotz MG, Urakawa H, Pinel N, Arp DJ, Brochier-Armanet C, Chain PSG, Chan PP, Gollabgir A, Hemp J, Hügler M, Karr EA, Könneke M, Shin M, Lawton TJ, Lowe T, Martens-Habbena W, Sayavedra-Soto LA, Lang D, Sievert SM, Rosenzweig AC, Manning G, Stahl DA. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(19): 8818–8823.
- [43] Jung MY, Well R, Min D, Giesemann A, Park SJ, Kim JG, Kim SJ, Rhee SK. Isotopic signatures of N₂O produced by ammonia-oxidizing archaea from soils. *ISME Journal*, 2014, 8(5): 1115–1125.
- [44] Yan J, Haaijer SCM, Op Den Camp HJM, van Niftrik L, Stahl DA, Könneke M, Rush D, Damste JSS, Hu YY, Jetten MSM. Mimicking the oxygen minimum zones: stimulating interaction of aerobic archaeal and anaerobic bacterial ammonia oxidizers in a laboratory-scale model system. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(12): 3146–3158.
- [45] Sauder LA, Ross AA, Neufeld JD. Nitric oxide scavengers differentially inhibit ammonia oxidation in ammonia-oxidizing archaea and bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(7): fnw052.
- [46] Tourna M, Stieglmeier M, Spang A, Könneke M, Schintlmeister A, Urich T, Engel M, Schlöter M, Wagner M, Richter A, Schleper C. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(20): 8420–8425.
- [47] Lehtovirta-Morley LE, Stoecker K, Vilcinskas A, Prosser JI, Nicol GW. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(38): 15892–15897.
- [48] Lehtovirta-Morley LE, Ross J, Hink L, Weber EB, Gubry-Rangin C, Thion C, Prosser JI, Nicol GW. Isolation of ‘*Candidatus Nitrosocosmicus franklandus*’, a novel ureolytic soil archaeal ammonia oxidiser with tolerance to high ammonia concentration. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(5): fiw057.
- [49] Chen HY, Yue YY, Jin WB, Zhou X, Wang QL, Gao SH, Xie GJ, Du S, Tu RJ, Han SF, Guo KX. Enrichment and characteristics of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment process. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 323: 465–472.
- [50] Caranto JD, Lancaster KM. Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(31): 8217–8222.
- [51] Van Kessel MAHJ, Speth DR, Albertsen M, Nielsen PH, Op Den Camp HJM, Kartal B, Jetten MSM, Lüscher S. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 2015, 528(7583): 555–559.

Application of inhibitors in research of ammonia oxidizing microorganisms

Weiling Yang, Jiajie Hu, Baolan Hu*

College of Environmental & Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China

Abstract: A variety of inhibitors are commonly used in related research on ammonia-oxidizing microorganisms, including inhibitors for nitrification and inhibitors against microbial growth. Since the discovery of ammonia-oxidizing archaea, researchers have re-screened different inhibitors to meet the needs of the study of ammonia oxidizing microorganisms. Inhibitors both accelerate the enrichment of archaea, and help researchers to distinguish between archaea and bacteria for their contribution to nitrification and their own anabolic potential. In this paper, the concentrations and inhibitory effects of various inhibitors were reviewed, including traditional inhibitors, like dicyandiamide, 3,4-dimethylpyridine phosphate, and allylthiourea; alkyne inhibitors such as 1-octyne; nitric oxide scavengers and antibiotics. These inhibitors are specific or versatile in their ability to inhibit the activity and growth of ammonia-oxidizing microorganisms. By summarizing these inhibitors, we hope to provide a reference for the choice of inhibitor in the research of ammonia oxidizing microorganisms.

Keywords: nitrification inhibitors, ammonia-oxidizing bacteria, ammonia-oxidizing archaea, dicyandiamide, acetylene, 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl 3-oxide

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41773074, 41641031, 51478415), by the Open Project of State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, by the Harbin Institute of Technology (QAK201714) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2017XZZX010-03)

*Corresponding author. E-mail: blhu@zju.edu.cn

Received: 22 December 2017; Revised: 1 February 2018; Published online: 23 March 2018