



重庆紫色水稻土中“全程”和“半程”氨氧化微生物的垂直分异

万琪慧¹, 王书玲¹, 赵伟焯¹, 马黎华¹, 贾仲君², 蒋先军^{1*}

¹西南大学资源环境学院, 重庆 400715

²中国科学院南京土壤研究所, 江苏 南京 210008

摘要:【目的】系统评估全程氨氧化细菌(complete ammonia oxidizing bacteria, Comammox bacteria)、半程氨氧化细菌(AOB)和古菌(AOA)在典型水稻土剖面的垂直分异规律。2015年发现的“全程”氨氧化细菌(Comammox *Nitrospira*)可将氨分子一步氧化为硝酸盐, 实现硝化作用。而经典的“半程”氨氧化细菌(AOB)或古菌(AOA)将氨分子氧化为亚硝酸盐后, 再由系统发育完全不同的硝化细菌将其氧化为硝酸盐。全程氨氧化细菌实现了一步硝化全过程, 根本改变了学术界对2类微生物分步硝化的经典认知, 但相关研究仍处于初步阶段。【方法】选择重庆北碚地区2017年典型水稻土并采集5、10、20和40 cm不同深度土壤(剖面采样点的上下误差不超过1 cm), 提取水稻土总DNA后, 利用标靶功能基因 *amoA*, 通过实时荧光定量PCR技术分析全程氨氧化细菌(Comammox)、半程氨氧化细菌(AOB)和古菌(AOA)在水稻土不同深度的数量变异规律。【结果】半程氨氧化细菌AOB和古菌AOA均随土壤深度增加呈显著下降趋势。然而, 全程氨氧化细菌的两大类微生物则表现出相反的规律, Comammox Clade A的丰度随着土壤剖面的加深而显著增加($P < 0.05$), 但Clade B并未有类似规律。Clade A在水稻土不同层次的土层中均比Clade B高出1个数量级, 在5 cm和40 cm处的最低和最高值分别为 3.42×10^7 、 8.46×10^7 copies/g。AOA与AOB的丰度大致相当, 5 cm剖面处数量最高分别为 1.23×10^7 、 1.83×10^5 copies/g, 但其平均丰度远低于全程氨氧化细菌, Comammox与AOA、AOB *amoA* 功能基因拷贝数之比为10–2000。【结论】全程氨氧化细菌(Comammox bacteria)广泛分布于水稻土不同土层中, 且数量远高于“半程”氨氧化细菌和古菌, 意味着Comammox可能在水稻土硝化作用中起重要作用。

关键词: 氮循环, 氨氧化微生物, 硝化作用, 亚硝酸细菌

一个世纪以来, 俄罗斯科学家 Sergei Winogradsky 提出的“分步硝化作用”理论奠定了硝化作用的基础: 由2组不同的微生物分2步完成——首先通过氨氧化微生物 AOM(氨氧化细菌

基金项目: 国家自然科学基金项目(41671232); 国家重点研发计划项目(2016TFD0300901)

*通信作者。Tel: +86-10-68251249; E-mail: jiangxj@swu.edu.cn

收稿日期: 2018-03-31; 修回日期: 2018-05-31; 网络出版日期: 2018-08-09

AOB, 氨氧化古菌(AOA)将氨氧化为亚硝酸盐(NO_2^-), 再通过亚硝酸氧化细菌(NO_B)将亚硝酸盐氧化为硝酸盐(NO_3^-)。根据最理想动力学理论^[1-2], Costa^[3]等认为单步硝化比分步硝化(氨氧化和亚硝酸盐氧化)代谢途径更短, ATP合成效率更高, 在热力学上由1种微生物完成将氨2步氧化为硝酸盐是可行的。直到2015年, 研究者们分别在不同环境中发现了3种可纯培养的细菌(*Candidatus Nitrospira nitrosa*、*Candidatus Nitrospira nitrificans*)和(*Candidatus Nitrospira inopinata*)和1种未纯培养的细菌(类*Nitrospira*)^[4-6], 这些微生物都具备单独将氨氧化为硝酸盐的能力, 均属于亚硝酸盐氧化细菌(NO_B)中硝化螺菌属(*Nitrospira*), 被定义为全程氨氧化微生物(complete ammonia oxidizers, comammox)。只能够将氨氧化为亚硝酸盐的AOA、AOB和只能氧化亚硝酸盐的NO_B则可被称为“半程”氨氧化微生物(incomplete ammonia oxidizers)^[3,5]。学者们根据已发表和更新的宏基因组数据库, 进行基因序列比对后发现, 全程氨氧化细菌广泛分布于农业土壤(稻田水域)^[5], 淡水环境、工程系统如污水处理厂(WWTPs)^[4], 饮用水处理厂(DWTPs)^[6], 水产养殖系统(RAS)^[7], 甚至大气颗粒物中^[8]。此外, 全程氨氧化微生物(Comammox)的发现, 引发了许多与硝化作用相关的科学问题。例如不同生态系统中, 全程氨氧化微生物(Comammox)、AOA和AOB的分布及其对硝化作用的相对贡献。

最新研究表明, 相比氨氧化微生物(AOA和AOB), 全程氨氧化细菌*Nitrospira inopinata*对氨具有更高的亲和力^[9], 且具有2种能在低氧浓度下高效表达的氨氧化单拷贝基因^[10], 在低氨和微氧环境中比AOA和AOB更具竞争优势^[11-12]。由于不同深度土壤剖面层次全氮等养分、pH等指标表

现出强烈的环境梯度, 氧化还原电位作为水稻土剖面层次重要变化因素, 亦影响硝化作用^[13-15]。Wang等^[16]研究了由北至南(海伦、常熟、鹰潭)的3种水稻土0-1 m不同土壤剖面层次微生物群落的变化, 结果表明AOA和AOB *amoA*功能基因均随土壤层次加深显著降低。全程氨氧化细菌的发现引起硝化作用过程中, “半程”氨氧化微生物和全程氨氧化微生物在不同环境中的生态位分化, 将成为最近研究的热点问题。本文选取重庆长期耕作的冬水田水稻土为研究对象, 采用微生物分子生物学研究方法, 旨在了解水稻土不同层次全程氨氧化微生物以及“半程”氨氧化微生物的丰度变化, 重新评估Comammox(Clade A和Clade B)、AOA和AOB *amoA*功能基因的生态位分化及其对硝化作用的相对贡献, 为更深一步理解农业生产土壤的氮循环提供前期基础。

1 材料和方法

1.1 试验地概况

试验地位于重庆市北碚区西南大学试验农场(106°26'E, 30°26'N), 海拔230 m, 属亚热带湿润季风气候, 年平均气温18.3 °C, 年平均降雨量1105 mm。土壤为中生代侏罗系沙溪庙组灰棕紫色沙泥岩母质上发育的中性紫色水稻土。该试验点自1990年开始实施长期定位试验, 每个处理4个重复, 小区面积为20 m²。本研究选择的试验处理取自冬水田(flooded paddy field, FPF), 稻田终年处于淹水状态, 保持水层深度为3 cm左右; 水稻收获后将稻茬[50-60 cm, 3850-4100 kg/(hm²·a)]和杂草[2750-3150 kg/(hm²·a)]翻入土中, 春季翻耕种植中稻, 耕作深度为25-30 cm, 按传统方法每年三犁三耙翻耕种植水稻, 水稻收获后灌冬水。

各小区施肥量均相同, 施肥量均为: 尿素 273.1 kg/hm²; 过磷酸钙 500.3 kg/hm²; 氯化钾 150.1 kg/hm²。每年水稻都是过磷酸钙作底肥一次施用; 尿素用量的 2/3 作底肥, 1/3 作追肥; 氯化钾底肥和追肥各半。播种、施肥、水分管理一致。

1.2 土壤样品制备与培养

土壤样品采集于 2017 年 11 月, 在试验农场水稻田 4 个小区分别取样, 每个小区按五点取样法, 分别用取土钻采取水稻田 4 个小区中 5、10、20、40 cm (剖面采样点的上下误差不超过 1 cm) 土壤剖面层次的土样, 带回实验室后去除枯枝落叶等非土壤成分, 分两部分储存: 一部分鲜土风干至含水量 15%–20%, 过 2 mm 筛, 采取四分法均匀采集部分样品, 立即进行土壤硝化势的测定和土壤 DNA 的提取, 另一部分土样风干磨细后过 1 mm 及 0.25 mm 筛, 用于测定土壤 pH、有机质、全氮等基本理化性质。土壤性质见图 1。

1.3 土壤基本理化性质的测定

土壤的含水量(H₂O)采用烘干法进行测定; 土壤 pH 值于 1:2.5 土水比条件下, 采用梅特勒 LE 438 复合电极(梅特勒-托利多仪器有限公司, 上海, 中国) 进行测定; 有机质用 K₂Cr₂O₇-H₂SO₄ 容量法测定, 全氮采用改进的凯氏法测定^[17]; 速效磷采用碳酸氢钠-分光光度计法测定; 速效钾采用醋酸铵-火焰光度计法测定^[18]。所有样品均设置 3 次重复。土壤硝态氮和铵态氮均采用流动分析仪测定(AA3 全自动连续流动分析仪, SEAL Analytical, 德国)。所有样品均设置 3 次重复。

硝化势(potential nitrification rate, PNR)的测定采用好气培养法^[19], 稍作修改, 具体如下: 称取 15 g 鲜土置于三角瓶中, 加入(NH₄)₂SO₄ 调节 NH₄⁺-N 的浓度到 40 mg/100 g, 按干土的质量计

算, 田间持水量调节到 60%。将三角瓶放到摇床, 在室温 25 °C 下振荡 24 h。在第 2、4、22、24 小时分别采取 10 mL 的振荡悬浊液, 以 1 mol/L KCl 溶液振荡浸提, 过滤, 用 AA3 全自动流动分析仪(SEAL Analytical, 德国)测定悬浊液中 NO₃⁻-N 的含量。另按上述土:水比测定原始土壤中 NO₃⁻-N 含量, 均 2 次重复。以培养时间为横坐标, NO₃⁻-N 含量为纵坐标, 求出斜率, 即土壤硝化势[mg N/(kg·d)]。

1.4 DNA 的提取

采用 FastDNA[®] SPIN Kit for Soil(MP Biomedicals)试剂盒进行提取土壤基因组总 DNA, 称取 0.5 g 于-80 °C 保存的土壤样品, 按试剂盒提供的操作步骤进行。FastPrep[®] FP120 细胞破碎仪中进行细胞破碎处理, 速度 6 m/s, 时间 40 s。提取的 DNA 在 1%的琼脂糖凝胶中进行电泳检测, 并将提取的 DNA 保存于-20 °C 用于后续分析。

1.5 定量 PCR

实时荧光定量 PCR 法在 QuantStudio[™]6 Flex 定量 PCR 仪(Thermo Fisher Scientific, Singapore) 上测定氨氧化古菌(AOA)、氨氧化细菌(AOB)、全程氨氧化菌 Comammox Clade A 和 Clade B *amoA* 基因的拷贝数。AOB、AOA、Comammox Clade A 和 Clade B 的 *amoA* 基因定量 PCR 所用扩增引物见表 1。AOB、AOA、Comammox Clade A 和 Clade B 的 *amoA* 基因定量 PCR 所用反应体系均为 20 μL, 主要包含: 待扩增的模板 DNA 1 μL、上下引物及 ROX 染料各 0.4 μL, *Taq* DNA 聚合酶 10 μL、灭菌水 7.8 μL。AOA *amoA* 基因定量 PCR 扩增条件为: 95 °C, 1.5 min; 40×(95 °C, 30 s; 55 °C, 45 s; 72 °C, 45 s)。AOB *amoA* 基因定量 PCR 扩增条件为: 95 °C, 3.0 min; 38×(95 °C, 30 s; 60 °C, 1.5 min)。Comammox Clade A、

Comammox Clade B 的 *amoA* 基因定量 PCR 扩增条件均为: 95 °C, 3.0 min; 45×(95 °C, 30 s; 52 °C, 45 s; 72 °C, 1 min)。

通过液体 LB 培养基培养的含有目的基因的克隆子, 按试剂盒 MiniBEST Plasmid Purification Kit 说明书提取、纯化质粒后, 首先对质粒进行测序验证, 然后在 NanoDrop®ND-1000 UV-Vis 分光光度计上测定质粒的浓度, 并计算出目的基因的

拷贝数。最后用 TE 缓冲溶液将质粒连续稀释 6–8 个梯度以制作定量 PCR 的标准曲线。

1.6 数据处理与分析

数据采用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 17.0 进行统计分析。采用单因素(one-way ANOVA)、Duncan 法进行方差分析及多重比较, 显著性水平设定为 $\alpha=0.05$ 。利用 Origin 8.6 软件作图。图表中数据为平均值±标准差。

表 1. AOB、AOA、Comammox Clade A、Comammox Clade B *amoA* 基因的引物序列

Table 1. Primers for AOB, AOA, Comammox Clade A, Comammox Clade B *amoA* gene

Target gene	Primer sequence (5'→3')	Reference
AOB <i>amoA</i> gene	amoA-1F (GGGGTTTCTACTGGTGGT)	[20]
	amoA-2R(CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC)	
AOA <i>amoA</i> gene	Arch -amoAF(STAATGGTCTGGCTTAGACG)	[21]
	Arch-amoAR(GCGGCCATCCATCTGTATGT)	
	comaA-244f_a TACAACCTGGGTGAACTA	
	comaA-659r_a AGATCATGGTGCTATG	
	comaA-244f_b TATAACTGGGTGAACTA	
	comaA-659r_b AAATCATGGTGCTATG	
Comammox Clade A <i>amoA</i> gene	comaA-244f_c TACAATTGGGTGAACTA	[22]
	comaA-659r_c AGATCATGGTGCTGTG	
	comaA-244f_d TACAACCTGGGTCAACTA	
	comaA-659r_d AAATCATGGTGCTGTG	
	comaA-244f_e TACAACCTGGGTCAATTA	
	comaA-659r_e AGATCATCGTGCTGTG	
	comaA-244f_f TATAACTGGGTCAATTA	
	comaA-659r_f AAATCATCGTGCTGTG	
	comaB-244f_a TAYTTCTGGACGTTCTA	
	comaB-659r_a ARATCCAGACGGTGTG	
	comaB-244f_b TAYTTCTGGACATTCTA	
	comaB-659r_b ARATCCAAACGGTGTG	
Comammox Clade B <i>amoA</i> gene	comaB-244f_c TACTTCTGGACTTTCTA	[22]
	comaB-659r_c ARATCCAGACAGTGTG	
	comaB-244f_d TAYTTCTGGACGTTTTA	
	comaB-659r_d ARATCCAAACAGTGTG	
	comaB-244f_e TAYTTCTGGACATTTTA	
	comaB-659r_e AGATCCAGACTGTGTG	
comaB-244f_f TACTTCTGGACCTTCTA		
comaB-659r_f AGATCCAAACAGTGTG		

2 结果和分析

2.1 冬水田水稻土不同剖面层次土壤基本性质

水稻土不同剖面层次土壤的基本性质如图 1 所示。由图 1 可见, 在水稻土不同剖面层次土壤的基本性质存在差异, 所列指标表现为表层土壤指标含量高于下层土壤。土壤有机质的分解能够为硝化作用提供能量, 但也可以抑制硝化作用。在本研究中, 有机质、全氮、碱解氮、Eh 随土壤剖面加深均呈显著下降趋势, 全磷含量和有效磷含量在 5 cm 处, 显著高于下层土壤(分别为 1.22–0.43 g/kg 和 31.57–6.96 mg/kg)。不同剖面层次的全钾和有效钾含量具有相似规律, 分别显著降低(23.5–14.0 g/kg 和 93.76–74.48 mg/kg)。土壤不同剖面层次的 pH 变化不显著, 在 7.7–7.9 之间,

土壤含水量从上至下依次为 76.38%、61.67%、42.10%和 62.98%。

2.2 全程氨氧化细菌(Comammox)在水稻土不同层次的分布

全程氨氧化细菌分支 A(Comammox Clade A)和分支 B(Comammox Clade B)丰度随土壤剖面不同层次的变化情况如图 2 所示。由图 2-A 可得, 随土壤剖面层次加深, 5、10、20 及 40 cm 处 Comammox Clade A *amoA* 功能基因拷贝数依次显著性增加($P < 0.05$), 10 cm、20 cm、40 cm 分别为 5 cm (3.42×10^7 copies/g)基因拷贝数(以干土计)的 1.6、1.7 和 2.5 倍。而冬水田土壤不同剖面层次 Comammox Clade B *amoA* 功能基因拷贝数(以干土计), 并没有类似规律(图 2-B), 整体比 Comammox Clade A 低 1 个数量级, 表现为 10 cm、

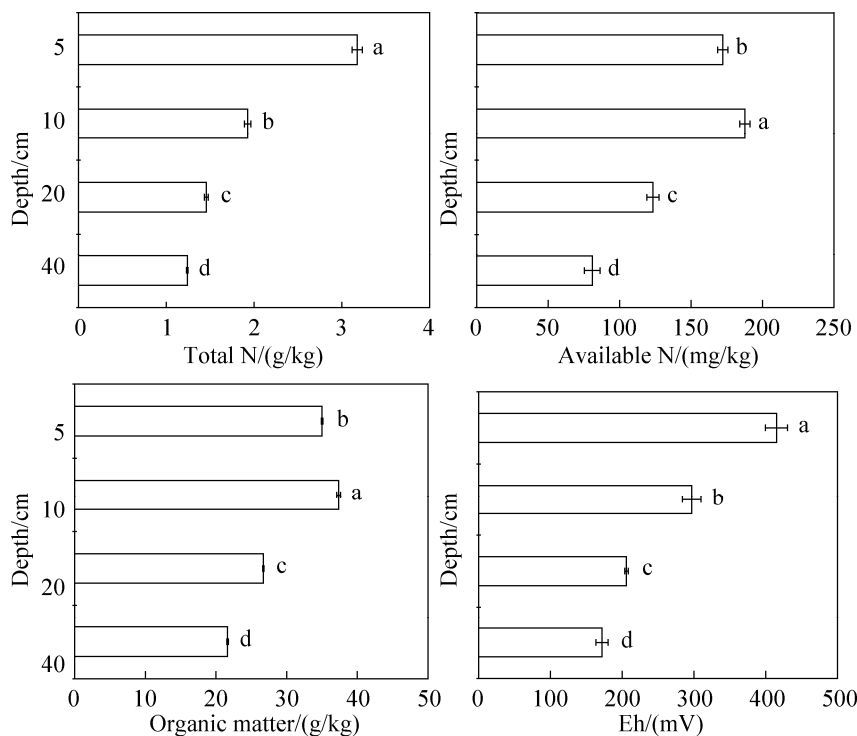


图 1. 冬水田不同剖面层次土壤的基本理化性质

Figure 1. Basic physical and chemical properties at different soil layers in flooded paddy field. Values followed by different small letters within a column are significantly different at the 0.05 probability level.

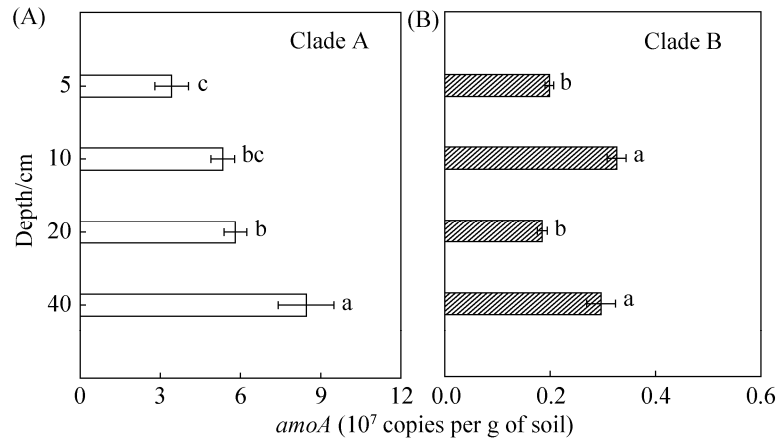


图 2. 冬水田不同剖面层次的 *Comammox amoA* 功能基因拷贝数

Figure 2. The abundances of *Comammox* Clade A (a) and Clade B (b) *amoA* genes at different depths in flooded paddy field (FPF). Values followed by different small letters within a column are significantly different at the 0.05 probability level.

40 cm 处 (3.26×10^6 copies/g、 2.97×10^6 copies/g) 基因拷贝数显著高于 5 cm、20 cm (1.99×10^6 copies/g、 1.85×10^6 copies/g)。

2.3 氨氧化古菌(AOA)、氨氧化细菌(AOB)在水稻土不同层次的分布

由图 3-A 可见, 冬水田 5 cm、10 cm 和 20 cm 中 AOA *amoA* 功能基因拷贝数(以干土计)依次显著降低, 分别为 1.23×10^7 copies/g、 1.19×10^7 copies/g

和 6.30×10^6 copies/g ($P < 0.05$)。40 cm 处基因拷贝数又显著增加到 1.16×10^7 copies/g。水稻土的土壤不同层次的 AOB *amoA* 功能基因拷贝数(图 3-B)显示出与 AOA 的变化规律类似, 5 cm (1.83×10^5 copies/g) 与 10 cm (1.37×10^5 copies/g) 无显著差异, 分别为 20 cm 处基因拷贝数的 5.6 和 4.2 倍, 40 cm 处基因拷贝数又显著增加到 20 cm 处的 3.3 倍, 但整体较 AOA *amoA* 功能基因拷贝数降低了 2 个数量级。

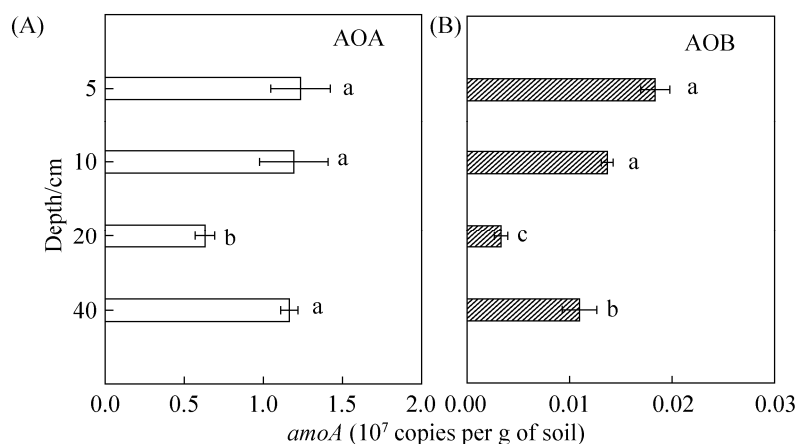


图 3. 冬水田不同剖面层次 AOA、AOB *amoA* 功能基因拷贝数

Figure 3. The abundances of ammonia-oxidizing archaea AOA (A) and ammonia-oxidizing bacteria AOB (B) *amoA* genes at different depths in flooded paddy field (FPF). Values followed by different small letters within a column are significantly different at the 0.05 probability level.

2.4 冬水田水稻土不同剖面层次硝化过程中硝化速率

从图 4 可见, 水稻土 5cm 的土壤剖面层次中硝化速率最高[40.70 mg N / (kg·d)], 分别是水稻土 10、20、40 cm 处硝化速率的 1.52 倍、7.45 倍和 8.69 倍, 进一步表明在水稻土土壤上层剖面层次中硝化作用更强烈。而 20 cm 与 40 cm 的潜在硝化速率无显著差异, 分别是 5.46 和 4.69 mg N / (kg·d), 且稻田土壤剖面层次加深后, 硝化作用显著降低($P < 0.05$)。这与前人报道相似^[15]。

2.5 冬水田水稻土不同层次中土壤化学性质与硝化微生物丰度的关系

对水稻土不同土壤层次 5、10、20、40 cm 的 Eh、有机质、全氮、碱解氮与硝化微生物丰度相关性分析结果如表 2 所示。从表中可见, 水稻土剖面不同层次的 Eh、有机质、全氮、碱解氮与 Comammox Clade A *amoA* 基因拷贝数具有显著负相关关系($P < 0.05$); 与 Comammox Clade B *amoA* 基因拷贝数也呈负相关关系, 但不显著。说明随着土壤剖面加深 Eh 显著降低后, Comammox

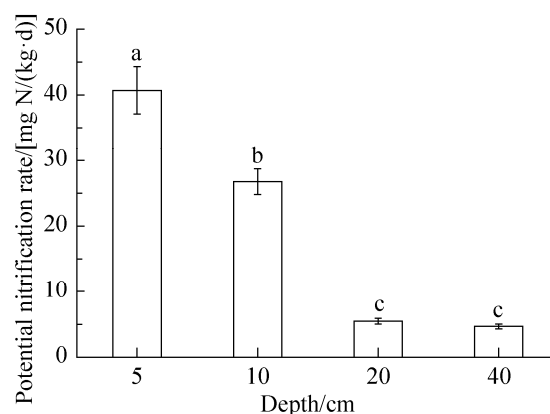


图 4. 水稻土不同深度土壤潜在硝化速率的变化
Figure 4. Potential nitrification rate (PNR) at different depths in flooded paddy field (FPF). Error bars represent standard deviations, $n=3$. The different letters above the columns indicates a significant differences at $P < 0.05$.

(分支 A 与分支 B 之和)的丰度呈上升趋势, 推测 Comammox 更适应于土壤深层低氧及贫营养条件。水稻土中, 不同土壤剖面层次的 Eh 与 AOB *amoA* 基因拷贝数具有极显著正相关关系 ($P < 0.01$), 与 AOA *amoA* 基因拷贝数也呈正相关关系, 但不显著。说明 AOB 相较于 AOA, 对氧气的响应更敏感。

表 2. 水稻土不同剖面深度土壤化学性质与硝化微生物丰度相关性

Table 2. Pearson's correlation coefficients among abundance of nitrification microorganism and soil properties in different soil depths of paddy field

	Eh	OM	TN	AN	Comammox Clade A	Comammox Clade B	AOA	AOB
Eh	1.000							
OM	0.804*	1.000						
TN	0.981**	0.714*	1.000					
AN	0.788*	0.994**	0.699	1.000				
Comammox Clade A	-0.842**	-0.769*	-0.895**	-0.779*	1.000			
Comammox Clade B	-0.125	0.133	-0.262	0.080	0.402	1.000		
AOA	0.166	0.370	0.050	0.323	0.102	0.793**	1.000	
AOB	0.751**	0.595	0.706	0.523	-0.379	0.371	0.565	1.000

* Significant at $P < 0.05$, ** significant at $P < 0.01$.

3 讨论

据已发表的宏基因数据库中 DNA 序列比对后, 研究者推测全程氨氧化微生物可能广泛分布于土壤、淡水等生态环境和工程系统中^[4-6,10]。Bartelme 等^[8]在再循环水产养殖系统(RAS)的生物过滤器中, 检测到 Comammox 丰度达到 10^8 copies/g, 高于 AOA 丰度。本研究稻田土壤不同剖面点位 5、10、20 和 40 cm 中, 全程氨氧化细菌(Comammox bacteria) *amoA* 基因拷贝数, 数量级均较高, 分支 A (Comammox Clade A)与分支 B(Comammox Clade B) *amoA* 基因拷贝数分别为 3.42×10^7 – 8.46×10^7 和 1.85×10^6 – 3.26×10^6 copies/g, 为全程氨氧化细菌广泛分布于农田土壤提供了可参考的数据。其次土壤剖面 4 个点位的 Comammox *amoA* 基因拷贝数(Clade A 和 Clade B 之和)与 AOA、AOB 的比值及 AOA 与 AOB 的比值均大于 3 (表 3), 表明冬季休闲水稻土不同层次中的全程氨氧化细菌 *amoA* 基因拷贝数最高, 其次是氨氧化古菌, 而氨氧化细菌最低。表明在冬季休闲水稻土的硝化微生物中, 全程氨氧化细菌比 AOA、AOB 占有更大的比例。

已有研究表明, AOA 主要在较苛刻的环境包括低氮、强酸性和高温的环境中发挥功能活性^[23-24], AOB 在高氮投入的中性和碱性土壤中是

硝化作用的主要驱动者。前人传统观念普遍认为相较于 AOB, AOA 对氨有更强的亲和力。Kit 等最新研究结果^[9]显示根据氨氧化动力学分析, Comammox (*Nitrosopumilus inopinata*)的 $K_m(\mu\text{mol/L NH}_3)$ 值为 0.063, 显著低于 AOA(*Nitrososphaera*, *N. maritimus* SCM1, *Ca. N. uzonensis*)的 $K_m(0.41$ – $0.96 \mu\text{mol/L NH}_3)$, 且比 AOB 低了 4–2500 倍。这就表明氨寡营养条件下 Comammox 可与 AOA 共存, 并直接竞争可用的氨, 如饮用水处理系统、地下水井^[5-8,25]。此外, 学者们还发现相比于 AOA、AOB 的耐氧卡尔文循环(Calvin-Benson-Bassham)和羟基丙酸-羟基丁酸循环, Comammox *Nitrospira* 具有微量需氧的 rTCA 途径^[10], 基因序列中有与氧化应激抵抗和氧清除相关的 2/2 血红蛋白 II(TrHb2), 这些特征表明在微量氧气环境中, Comammox 可能更具有竞争优势。Lawson 等发现 Comammox *Nitrospira* 的化学计量耗氧量([mol O₂: NH₃] 2.0)比 AOB(1.5)大, 但 *Nitrospira* 仍会形成较小的典型细胞簇^[26], 因而推测菌落大小对 $K_{O(\text{app})}$ 影响最强^[27], 也会使 Comammox 在氧含量不足条件下的活性污泥中具有竞争优势。研究显示滨海新区水稻土中仅表土 0–4 cm 可以检测到溶解氧的含量^[28], 深层土壤溶解氧极低, 淹水水稻土中 3 cm 处氧浓度已降为 0^[29]。本研究结果显示 Comammox 分支 A 的丰度与水稻土不同层次的 Eh、全氮具有

表 3. 氨氧化微生物丰度比值

Table 3. The ratios of nitrifying microorganisms at different depths in flooded paddy field (FPF)

Depth	AOA /AOB	Comammox /AOA	Comammox /AOB	Clade A /Clade B	Clade A /AOA	Clade A /AOB	Clade B /AOA	Clade B /AOB
5 cm	57.0±8.80c	3.40±0.40c	192±2.30c	22.3±2.40b	3.28±0.34c	183±6.20d	0.15±0.01c	8.58±0.29c
10 cm	118±15.4b	3.50±0.20c	415±8.63bc	16.3±0.50c	3.34±0.22c	391±17.7c	0.21±0.02b	24.0±0.54b
20 cm	199±18.4a	10.2±0.30a	2044±23.1a	33.6±1.30a	9.93±0.32a	1984±7.32a	0.30±0.01a	59.5±3.21a
40 cm	110±12.9b	7.50±0.70b	816±8.34b	28.5±2.40a	7.23±0.67b	788±25.2b	0.25±0.01ab	27.7±1.66b

Values followed by different small letters within a column are significantly different at the 0.05 probability level.

极显著负相关关系(表 2), Comammox(分支 A 和分支 B 之和)与 AOA、AOB 的 *amoA* gene 丰度比值, 分别在 3.4–10.2 和 192–2044 之间(表 3), 比 AOA、AOB 分别高了 1 和 3 个数量级。由此推断, 可能在深剖面层氮磷含量不足、微量氧浓度的营养环境中, Comammox *Nitrospira* 单步硝化作用相对于两步进行的硝化作用将更具有竞争优势^[30–31]。

此外, Pjevac^[22]等在德国沃尔芬比特尔的水厂地下水井(GWW)的悬浮泥浆中检测到, Comammox Clade A 和 Comammox Clade B 的丰度均高于 10^4 gene copies/ng DNA, 远远高于 AOB *amoA* 的基因拷贝数, 这与 Daims^[5]的研究结果一致。而水稻土中 Comammox Clade A *amoA* 基因拷贝数高于 Comammox Clade B, 范围在 10^2 – 10^3 gene copies/ng DNA, 表明 Comammox Clade A 对于地下水井等工程系统及水稻土的硝化作用可能有重要贡献。本研究结果表明全程氨氧化细菌 Clade A *amoA* 基因丰度达 10^7 copies/g, 也就是 10^3 gene copies/ng DNA, Clade B *amoA* 基因丰度在 10^2 gene copies/ng DNA, 且全程氨氧化细菌分支 A 的 *amoA* 基因丰度随土层加深显著增加, 说明中性冬季休闲水稻土中 Comammox Clade A 是优势种群。

水稻土壤剖面不同层次的硝化作用受氨(NH_3)浓度、Eh、pH 等多种因素影响。Zheng 等^[32]采用定量 PCR 技术分析白洋淀湖泊沉积物(距离水平面 6 m) 0–100 cm 分布的土样中, 发现在溶解氧含量较低的土壤层次中, AOA 丰度比 AOB 高, 意味着环境中除氨浓度之外, 溶解氧含量也是影响硝化作用^[33]以及 AOA、AOB 丰度^[34]的关键因素。Das 等^[35]对印度孟加拉湾北海岸的红树林森林土 0–60 cm 土壤剖面的微生物进行分析, 也发现总微生物量、硝化细菌、固氮细菌均随土层加深而降

低。本研究结果显示水稻土 5 cm、10 cm、20 cm 和 40 cm 剖面点位的土壤有机质、全氮等养分、Eh 以及硝化势, 均呈显著降低趋势(图 1 和图 4), AOA 与 AOB *amoA* 基因丰度均呈显著降低趋势, 全程氨氧化细菌 Clade A 与 AOA、AOB 的 *amoA* 基因丰度比值却显著增加(3.28–9.93 和 183–1984), 值得一提的是微生物的丰度并不代表其硝化活性, 因此推测水稻土深层贫瘠营养条件下 Comammox Clade A 可能起作用。

Comammox 的发现让人们走出传统两步硝化的“盒子思维”, 但是基因丰度数值并不意味着基因全部进行了表达, RNA 反转录、蛋白质等代谢水平的实验有可能更适应于评估全程氨氧化细菌的相对贡献度^[36]。此外, 以 PCR 为基础的实验, 标靶功能基因 *amoA* 的选择对实验结果的影响尤为关键^[37]。Orellana 等^[38]从美国中西部 2 个农业区(乌尔班纳和哈瓦那), 分别在周年内(4、6、9、11 月)采集了长期玉米和大豆轮作的沙土和壤土 0–5 cm 以及 20–30 cm 的土样, 结果表明添加 N 肥后, 奇古门菌 Thaumarchaeota 的 6 个深分支和 3 种全程氨氧化细菌(Comammox) *Nitrospira* 的数量均增加了 5 倍。也就是共营养条件下, 氨氧化古菌对氨浓度的响应可能更敏感。因此, 未来的研究方向集中在检测 Comammox *Nitrospira* 的原位活性, 能更好地确定它们在自然和工程系统中对硝化作用和其他营养循环的相对贡献。*Nitrospira* II 是唯一能够进行单步硝化的系统发育分支, 还是具有这种能力的微生物在 *Nitrospira* 及其以外的种属中也有分布, 目前仍是个谜。由于功能基因分析仅限于已知的基因, 不能提供这个问题的答案, 因此有必要采取新策略来评估 Comammox *Nitrospira* 对全球氮循环的实际贡献。

参考文献

- [1] Pfeiffer T, Bonhoeffer S. Evolution of cross-feeding in microbial populations. *The American Naturalist*, 2004, 163(6): E126–E135.
- [2] Heinrich R, Schuster S. The regulation of cellular systems. Berlin, MA: Springer, 1996.
- [3] Costa E, Pérez J, Kreft JU. Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends in Microbiology*, 2006, 14(5): 213–219.
- [4] 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.
- [5] Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, Jehmlich N, Palatinszky M, Vierheilig J, Bulaev A, Kirkegaard RH, von Bergen M, Rattei T, Bendinger B, Nielsen PH, Wagner M. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 2015, 528(7583): 504–509.
- [6] Pinto AJ, Marcus DN, Ijaz UZ, Bautista-De Lose Santos QM, Dick GJ, Raskin L. Metagenomic evidence for the presence of comammox *Nitrospira*-like bacteria in a drinking water system. *mSphere*, 2016, 1(1): e00054–15.
- [7] Gao JF, Fan XY, Pan KL, Li HY, Sun LX. Diversity, abundance and activity of ammonia-oxidizing microorganisms in fine particulate matter. *Scientific Reports*, 2016, 6: 38785.
- [8] Bartelme RP, McLellan SL, Newton RJ. Freshwater recirculating aquaculture system operations drive biofilter bacterial community shifts around a stable nitrifying consortium of ammonia-oxidizing *Archaea* and comammox *Nitrospira*. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 101.
- [9] Kits KD, Sedlacek CJ, Lebedeva EV, Han P, Bulaev A, Pjevac P, Daebeler A, Romano S, Albertsen M, Stein LY, Daims H, Wagner M. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. *Nature*, 2017, 549(7671): 269–272.
- [10] Palomo A, Pedersen AG, Fowler SJ, Dechesne A, Sicheritz-Pontén T, Smets BF. Comparative genomics sheds light on niche differentiation and the evolutionary history of comammox *Nitrospira*. *The ISME Journal*, 2018, 12(7): 1779–1793.
- [11] Ouellet H, Ranguelova K, LaBarre M, Wittenberg JB, Wittenberg BA, Magliozzo RS, Guertin M. Reaction of *Mycobacterium tuberculosis* truncated hemoglobin O with hydrogen peroxide: evidence for peroxidatic activity and formation of protein-based radicals. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(10): 7491–7503.
- [12] Torge R, Comandini A, Catacchio B, Bonamore A, Botta B, Boffi A. Peroxidase-like activity of *Thermobifida fusca* hemoglobin: the oxidation of dibenzylbutanolide. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 61(3/4): 303–308.
- [13] Höfferle Š, Nicol GW, Pal L, Hacin J, Prosser JI, Mandić-Mulec I. Ammonium supply rate influences archaeal and bacterial ammonia oxidizers in a wetland soil vertical profile. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 74(2): 302–315.
- [14] Leininger S, Urich T, Schlöter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442(7104): 806–809.
- [15] Qin HL, Zhang ZX, Lu J, Zhu YJ, Webster R, Liu XL, Yuan HZ, Hou HJ, Chen CL, Wei WX. Change from paddy rice to vegetable growing changes nitrogen-cycling microbial communities and their variation with depth in the soil. *European Journal of Soil Science*, 2016, 67(5): 650–658.
- [16] Wang HH, Li X, Li XY, Wang J, Zhang HW. Changes of microbial population and N-cycling function genes with depth in three Chinese paddy soils. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0189506.
- [17] 杨剑虹, 王成林, 代亨林. 土壤农化分析与环境监测. 北京: 中国大地出版社, 2008.
- [18] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [19] Chu HY, Fujii T, Morimoto S, Lin XG, Yagi K, Hu JL, Zhang JB. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(2): 485–491.
- [20] Beman JM, Francis CA. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bah í a del T ó bari, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(12): 7767–7777.
- [21] Rothauwe JH, Witzel KP, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4704–4712.
- [22] Pjevac P, Schaubberger C, Poghosyan L, Herbold CW, van Kessel MAHJ, Daebeler A, Steinberger M, Jetten MSM, Lüscher S, Wagner M, Daims H. *AmoA*-targeted polymerase chain reaction primers for the specific detection and quantification of comammox *Nitrospira* in the environment. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1508.

- [23] 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: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 2012, 6(5): 1032–1045.
- [24] Xia WW, Zhang CX, Zeng XW, Feng YZ, Weng JH, Lin XG, Zhu JG, Xiong ZQ, Xu J, Cai ZC, Jia ZJ. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. *The ISME Journal*, 2011, 5(7): 1226–1236.
- [25] Gonzalez-Martinez A, Rodriguez-Sanchez A, van Loosdrecht MCM, Gonzalez-Lopez J, Vahala R. Detection of comammox bacteria in full-scale wastewater treatment bioreactors using tag-454-pyrosequencing. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(24): 25501–25511.
- [26] Lawson CE, Lückner S. Complete ammonia oxidation: an important control on nitrification in engineered ecosystems? *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 50: 158–165.
- [27] Picioreanu C, Pérez J, van Loosdrecht MCM. Impact of cell cluster size on apparent half-saturation coefficients for oxygen in nitrifying sludge and biofilms. *Water Research*, 2016, 106: 371–382.
- [28] Bai R, Xi D, He JZ, Hu HW, Fang YT, Zhang LM. Activity, abundance and community structure of anammox bacteria along depth profiles in three different paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 91: 212–221.
- [29] Lüdemann H, Arth I, Liesack W. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2): 754–762.
- [30] Kageyama H, Tripathi K, Rai AK, Cha-um S, Waditee-Sirisattha R, Takabe T. An alkaline phosphatase/phosphodiesterase, PhoD, induced by salt stress and secreted out of the cells of *Aphanothece halophytica*, a halotolerant cyanobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(15): 5178–5183.
- [31] Shen YC, Hu YN, Shaw GC. Expressions of alkaline phosphatase genes during phosphate starvation are under positive influences of multiple cell wall hydrolase genes in *Bacillus subtilis*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2016, 62(2): 106–109.
- [32] Zheng L, Zhao X, Zhu GB, Yang W, Xia C, Xu T. Occurrence and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria from the surface to below the water table, in deep soil, and their contributions to nitrification. *Microbiology Open*, 2017, 6(4): e00488.
- [33] Dong YM, Zhang ZJ, Jin YW, Li ZR, Lu J. Nitrification performance of nitrifying bacteria immobilized in waterborne polyurethane at low ammonia nitrogen concentrations. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, 23(3): 366–371.
- [34] Erguder TH, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(5): 855–869.
- [35] Das S, Ganguly D, Maiti TK, Mukherjee A, Jana TK, De TK. A depth wise diversity of free living N₂ fixing and nitrifying bacteria and its seasonal variation with nitrogen containing nutrients in the mangrove sediments of Sundarban, WB, India. *Open Journal of Marine Science*, 2013, 3(2): 112–119.
- [36] Liu S, Shen LD, Lou LP, Tian GM, Zheng P, Hu BL. Spatial distribution and factors shaping the niche segregation of ammonia-oxidizing microorganisms in the Qiantang River, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(13): 4065–4071.
- [37] Jin T, Zhang T, Ye L, Lee OO, Wong YH, Qian PY. Diversity and quantity of ammonia-oxidizing *Archaea* and *Bacteria* in sediment of the Pearl River Estuary, China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(3): 1137–1145.
- [38] Orellana LH, Chee-Sanford JC, Sanford RA, Löffler FE, Konstantinidis KT. Year-round shotgun metagenomes reveal stable microbial communities in agricultural soils and novel ammonia oxidizers responding to fertilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(2): e01646–17.

Vertical abundance variations of “incomplete ammonia oxidizers” and “comammox” in purple paddy soil in Chongqing

Qihui Wan¹, Shuling Wang¹, Weiye Zhao¹, Lihua Ma¹, Zhongjun Jia², Xianjun Jiang^{1*}

¹ College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

² Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] Nitrification has been thought to be as a two-step process, where ammonia-oxidizing bacteria and archaea (AOB and AOA) first oxidize ammonia to nitrite, which nitrite-oxidizing bacteria (NOB) subsequently transfer to nitrate. Recently, the ability to oxidize ammonia has also been discovered in members of the genus *Nitrospira*, which were formerly supposed to only be capable of nitrite oxidation. The discovery of these bacteria that oxidize ammonia to nitrate (complete ammonia oxidizing bacteria, Comammox bacteria), refuted the dogma that the oxidation of ammonia and nitrite requires two distinct groups of microorganisms. The discovery of one-step nitrification and Comammox *Nitrospira* triggered many important scientific issues of the global nitrogen cycle, but relevant studies were still in the preliminary stage. [Methods] Using real-time quantitative PCR (Q-PCR), we characterized the distribution patterns of functional *amoA* gene abundances of Comammox (Clade A and Clade B), ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) at 5, 10, 20, and 40 cm soil depths (up-down error within 1 cm) of flooded paddy field (FPF) in Beibei, Chongqing in 2017. [Results] Quantitative PCR (Q-PCR) revealed that soil depth had a significant effect on different nitrifiers. Comammox *Nitrospira* were ecologically widespread and numerically abundant in all depths of the standard profile. The Comammox Clade A *amoA* gene copies were higher at deeper layers, while Comammox Clade B didn't show the same trends and its abundances varied between 1.85×10^6 copies/g and 3.26×10^6 copies/g in different depths of the standard profile. However, the abundance of Comammox Clade A was about to an order of magnitude more abundant than Comammox Clade B in paddy soils. On the contrary, the *amoA* gene abundances of AOA and AOB significantly decreased with increasing depth ($P < 0.05$), both AOA and AOB *amoA* gene abundances were highest in the top layer (5 cm, 1.23×10^7 copies/g and 1.83×10^5 copies/g, respectively). The ratio of abundances of Comammox *amoA* genes to those of AOA and AOB increased significantly with the increase of soil depth, ranged from 10 to 2000. [Conclusion] The complete ammonia oxidizing bacteria (Comammox bacteria) are widely distributed in all soil depths of paddy soil and their abundances were significantly higher than “incomplete ammonia oxidizers (AOA, AOB)”, which implicated that Comammox cannot be neglected in rice soil ecosystem.

Keywords: N cycle, ammonia-oxidizing microorganisms, nitrification, nitrite-oxidizing bacteria

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41671232) and by the National High Technology Research and Development Program of China (2016TFD0300901)

*Corresponding author. Tel: +86-10-68251249; E-mail: jiangxj@swu.edu.cn

Received: 31 March 2018; Revised: 31 May 2018; Published online: 9 August 2018