

DOI: 10.11766/trxb202002020040

唐修峰, 秦华, 匡璐, 王欣欣, 宋玉翔, 高豪, 刘林梦, 任一, 单军, 张焕朝, 王保战. 基于宏基因组学的酸性森林土壤氨氧化微生物群落特征研究[J]. 土壤学报, 2021, 58 (5): 1311–1321.

TANG Xiufeng, QIN Hua, KUANG Lu, WANG Xinxin, SONG Yuxiang, GAO Hao, LIU Linmeng, REN Yi, SHAN Jun, ZHANG Huanchao, WANG Baozhan. Metagenomics Based Study on Community Characteristics of Ammonia-Oxidizing Microorganisms in Acid Forest Soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021, 58 (5): 1311–1321.

## 基于宏基因组学的酸性森林土壤氨氧化微生物群落特征研究\*

唐修峰<sup>1, 2</sup>, 秦 华<sup>3</sup>, 匡 璐<sup>2</sup>, 王欣欣<sup>2</sup>, 宋玉翔<sup>2</sup>, 高 豪<sup>4</sup>, 刘林梦<sup>4</sup>, 任一<sup>4</sup>, 单 军<sup>2</sup>, 张焕朝<sup>1†</sup>, 王保战<sup>2, 5†</sup>

(1. 南京林业大学林学院, 南京 210037; 2. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 3. 浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室, 杭州 311300; 4. 上海美吉生物医药科技有限公司, 上海 201318; 5. 南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

**摘 要:** 全球 30%以上陆地面积是酸性土壤 (pH<5.5), 而酸性土壤中氨氧化微生物群落特征研究是破译其硝化过程微生物学机理的基础。尤其随着完全硝化微生物 (Complete ammonia oxidizer, comammox) 的发现, 亟需重新认知酸性土壤中氨氧化微生物类群。以酸性马尾松林为研究对象, 综合利用荧光定量 PCR (qPCR)、凝胶电泳半定量和宏基因组测序等技术研究土壤中氨氧化古菌 (Ammonia-oxidizing archaea, AOA)、氨氧化细菌 (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 和 Comammox 的相对丰度以及群落组成特征。研究发现 AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度分别为  $2.61 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> 和  $1.45 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup>; 而 comammox *amoA* 基因 qPCR 结果存在显著的非特异性扩增, 导致其丰度被高估, 而经凝胶电泳半定量矫正后, 约为  $(1.38 \sim 1.47) \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup>, 该结果和土壤宏基因组揭示的 comammox 相对丰度基本吻合。此外, 宏基因组分析发现经典嗜酸 group 1.1a-associated 仅占 AOA 总类群的 12%, 而 group 1.1b 则占 88%, 尽管目前仍未有嗜酸 group 1.1b AOA 纯菌株的报道。AOB 主要类群为 *Nitrosospira* (约 64%), 而 *Nitrosomonas* 约占 36%。Comammox 主要类群为 clade B (约 64%), 而 clade A 仅占 36%且均隶属于 clade A.1 亚枝, 这暗示 clade B 与已报道的嗜中性 comammox clade A 纯菌株有极大的生理代谢差异。总之, 本研究提供了综合利用 qPCR、半定量和宏基因组分析土壤氨氧化微生物群落的策略, 并建议优化 comammox 的 qPCR 引物, 同时本研究系统分析了酸性马尾松林土壤中氨氧化微生物的相对丰度和群落组成特征。

**关键词:** 酸性森林土壤; 氨氧化微生物; comammox; *amoA* 基因; 宏基因组学

**中图分类号:** S154.36      **文献标志码:** A

\* 浙江农林大学省部共建亚热带森林培育国家重点实验室开放基金 (KF2017-02) 和国家自然科学基金项目 (41977056, 41671252) 资助 Supported by the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture (No. KF2017-02) and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 41977056, 41671252)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: bzwang@issas.ac.cn; hc Zhang@njfu.edu.cn

作者简介: 唐修峰 (1994—), 男, 安徽芜湖人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: tangxiufeng@issas.ac.cn

收稿日期: 2020-02-02; 收到修改稿日期: 2020-04-08; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2020-05-18

## Metagenomics Based Study on Community Characteristics of Ammonia-Oxidizing Microorganisms in Acid Forest Soil

TANG Xiufeng<sup>1,2</sup>, QIN Hua<sup>3</sup>, KUANG Lu<sup>2</sup>, WANG Xinxin<sup>2</sup>, SONG Yuxiang<sup>2</sup>, GAO Hao<sup>4</sup>, LIU Linmeng<sup>4</sup>, REN Yi<sup>4</sup>, SHAN Jun<sup>2</sup>, ZHANG Huanchao<sup>1†</sup>, WANG Baozhan<sup>2,5†</sup>

(1. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 3. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China; 4. Shanghai Majorbio Bio-pharm Biotechnology Co., Ltd, Shanghai 201318, China; 5. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** 【Objective】 The acidic forest soils are characterized by low pH and depletion of NH<sub>3</sub> substrate, which are considered to be the major factors shaping ammonia-oxidizing communities (AOA, AOB and comammox) in soils. However, so far little is known about the relationship between absolute and relative numbers of the three kinds of ammonia oxidizers in acidic forest soils, especially due to the absence of reliable real-time quantitative PCR (qPCR) primers for the newly identified comammox *Nitrospira*. Here this study aims to develop a strategy to determine abundance of comammox *Nitrospira*, and to investigate community structures of AOA, AOB and comammox in the acidic forest soils. 【Method】 Absolute abundances of *amoA* genes of AOA, AOB and comammox in soils were measured with the aid of qPCR. However, Ntsp-amoA-162F/359R and comaB-244F/659R, the two primers for comammox *amoA* genes would trigger significant non-specific amplification, and hence overestimation of the abundance of comammox. Therefore, qPCR data of comammox *amoA* genes needs to be calibrated with the semi-quantitative method based on agarose gel electrophoresis of the qPCR products, and by the metagenomic sequencing of the total soil DNA. Furthermore, community compositions of AOA, AOB and comammox in the acidic forest soils were also characterized with the aid of metagenomic sequencing. 【Result】 The qPCR demonstrate that the *amoA* genes of AOA and AOB were  $2.61 \times 10^6$  and  $1.45 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup>, respectively in abundance, while the qPCR of comammox *amoA* gene exhibits significant non-specific amplification, and the calibrated data show that comammox *amoA* gene, was about  $1.38 \times 10^6$ – $1.47 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> in abundance. Furthermore, Group 1.1b was the predominant one, accounting for ~88.07% of AOA, while the classical 1.1a-associated acidophilic group accounted only for ~11.93%. Of AOB, *Nitrosospira* was the major group, accounting for ~63.96%, while *Nitrosomonas* made up ~36.04% of the total AOB gene sequence. Clade B was the major group, accounting for ~63.39% of the comammox, while Clade A accounted only for ~36.61% of total comammox *amoA* gene sequence and exclusively fell into Sub-clade A.1. 【Conclusion】 In this study, a strategy for determining the absolute abundance of comammox *amoA* genes in soil was developed based on comprehensive utilization of the techniques of qPCR, semi-quantitation and metagenomic analysis. In the acidic forest soils studied the ratio of comammox to AOA and AOB in *amoA* gene abundance is found to be ~0.55 and ~0.98, respectively. Group 1.1b, *Nitrosospira* and Clade B is the major group of AOA, AOB and comammox, respectively, in the soils, and the potential molecular mechanisms underpinning the adaption of these ammonia oxidizers to the environments low in pH and short of NH<sub>3</sub> substrates warrant further physio-biochemical studies of pure cultures.

**Key words:** Acidic forest soil; Ammonia-oxidizing microorganisms; Comammox; *amoA* gene; Metagenomics

硝化作用被认为是全球氮循环的关键步骤,是由微生物驱动通过亚硝酸根,将氨氧化成硝酸根的过程<sup>[1]</sup>。而氮素作为森林生态系统中主要的限制性营养元素<sup>[2]</sup>,其硝化作用产生的硝酸盐更易通过淋溶作用导致氮素流失和地下水污染等,此外硝酸根还可通过反硝化作用产生重要的温室气体氧化亚氮(N<sub>2</sub>O)。自1892年Winogradsky<sup>[3]</sup>发现氨氧化细菌

(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)以来,人们一直认为硝化过程由两类微生物接力完成,分别为AOB催化的氨氧化过程和亚硝酸盐氧化细菌(Nitrite-oxidizing bacteria, NOB)催化的亚硝酸氧化过程,其中氨氧化过程被认为是硝化作用的限速步骤<sup>[4]</sup>。2005年,美国科学家David A. Stahl团队<sup>[5]</sup>从海洋中分离出第一株氨氧化古菌(Ammonia-

oxidizing archaea, AOA), 证明除细菌外, 古菌也能够催化地球上的氨氧化过程。2015 年, Daims<sup>[6]</sup> 和 van Kessel<sup>[7]</sup> 等均发现了具有氨氧化活性的硝化螺旋细菌 (*Nitrospira*), 并证明其可将  $\text{NH}_4^+$  氧化成  $\text{NO}_3^-$ , 称为完全硝化微生物 (Complete ammonia oxidizer, comammox)。Comammox 的发现打破了上百年来人们认为硝化过程必须由两类微生物接力完成的传统观念, 使人们再次认识到硝化微生物的物种多样性和生理代谢机制的复杂。

酸性 pH 和低氨分子浓度是森林土壤的两个重要特征。一般认为酸性 pH 选择了严格嗜酸 group 1.1a-associated AOA 类群<sup>[8-10]</sup>, 且 DNA-SIP (稳定性同位素示踪) 实验证明该类 AOA 主导了森林土壤氨氧化过程<sup>[11]</sup>。但也有一些研究发现 group 1.1b AOA 可存在于酸性土壤<sup>[1, 12]</sup>, 且能主导某些酸性农田土壤氨氧化过程<sup>[13]</sup>, 以及 group 1.1b AOA 在酸性森林土壤中也广泛存在, 且在转录组水平发挥了较高的活性<sup>[14-15]</sup>。尽管关于 AOB 适应酸性 pH 及其相对应的低  $\text{NH}_3$  环境的机制目前多为推测<sup>[16-17]</sup>, 但不少森林土壤中确实存在  $\beta$ -proteobacterium ( $\beta$ -变形菌门) 中 *Nitrospira* (亚硝化螺旋菌) 属 AOB, 而 *Nitrosomonas* (亚硝化单胞菌) AOB 较少检测到<sup>[18-20]</sup>。最近日本科学家又从 pH 3.0 左右的酸性茶园土壤中分离到耐酸  $\gamma$ -proteobacterium ( $\gamma$ -变形菌门) AOB 菌株<sup>[21]</sup>, 然而森林土壤中是否存在耐酸  $\gamma$ -proteobacterium AOB 仍不清楚。此外最近备受关注的 comammox, 其在森林土壤中生理生态的研究也刚刚起步, 而已报道的 comammox *amoA* 基因 PCR 引物易产生非特异性扩增, 可能导致其基于实时荧光定量 PCR (qPCR) 的丰度被严重高估<sup>[22]</sup>。土壤总 DNA 宏基因组测序由于不受 PCR 引物偏好性等限制, 因此在土壤氨氧化微生物 *amoA* 基因相对丰度和群落组成的研究中更具优势。

马尾松林 (*Pinus massoniana*) 是我国南方广泛分布的主要人工林之一, 具有高经济价值、耐干旱贫瘠等特点<sup>[23]</sup>, 其土壤为典型的酸性森林土壤。本文以浙江省建德市人工马尾松林土壤为研究对象, 综合利用 qPCR、凝胶电泳半定量和土壤总 DNA 宏基因组测序等手段, 研究酸性森林土壤中 AOA、AOB 和 comammox 三种氨氧化微生物的丰度和群落组成等, 以期加深对酸性森林生态系统中氨氧化微生物潜在生理生态学特征的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

土壤样品于 2017 年 4 月采自浙江省建德市人工马尾松林 (119°28'E, 29°48'N), 该地区属亚热带海洋型季风气候, 海拔约 200 m, 年均气温 17.4 °C, 年均降水 1 600 mm。土壤类型为凝灰岩发育的红壤, 选择 3 个林龄均为 55 年的马尾松林 (间隔约 2 000 m), 分别标记为 M1、M2 和 M3。五点法采集 0~20 cm 土壤, 每个马尾松林采集 3 个样品, 样品分成两份, 一份保存于 -20 °C 用于提取土壤总 DNA, 另一份 4 °C 保存用于土壤理化性质测定。

### 1.2 土壤理化性质测定

土壤含水量采用烘干法。pH 采用电位法测量, 水土比为 5:1。有机碳含量通过浓硫酸-重铬酸钾法测定。全氮和碱解氮的含量分别采用半微量凯氏定氮法和碱解扩散法。有效磷测定采用 0.05 mol·L<sup>-1</sup> HCl 和 0.025 mol·L<sup>-1</sup> (1/2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 浸提-钼锑抗比色法。速效钾测定采用乙酸铵浸提-火焰光度法。经测定三个森林土壤 pH 为 3.88~4.16, 含水量 173.1~203.4 g·kg<sup>-1</sup>, 有机碳 14.01~16.62 g·kg<sup>-1</sup>, 全氮 0.76~1.02 g·kg<sup>-1</sup>, 碱解氮 123.24~142.81 mg·kg<sup>-1</sup>, 有效磷 6.34~10.49 mg·kg<sup>-1</sup>, 速效钾 56.12~60.15 mg·kg<sup>-1</sup>。

### 1.3 土壤 DNA 提取

土壤微生物总 DNA 提取采用 Fast DNA Spin kit for soil 试剂盒 (MP Biomedicals, 美国)。根据试剂盒操作说明提取土壤微生物总 DNA, 并使用 Nanodrop ND-1000 超微量分光光度计 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, 美国) 和 1% 的凝胶电泳检测 DNA 浓度和质量, 将 DNA 于 -20 °C 保藏。

### 1.4 实时荧光定量 PCR 和凝胶电泳半定量分析

利用美国伯乐公司 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, 美国) 对人工马尾松林土壤中 AOA、AOB 和 comammox 的 *amoA* 基因进行定量分析。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : 10  $\mu\text{L}$  SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa, 日本), 上下游引物 0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 2  $\mu\text{L}$  (约 1~10 ng) 模板 DNA, 补充 6  $\mu\text{L}$  双蒸水。qPCR 引物和反应条件见表 1<sup>[22, 24-26]</sup>。本实验每个样品设置三个重复, 每个重复包含三个测试平行。将含有 AOA、AOB 和 comammox *amoA*

基因的单克隆质粒 DNA 梯度稀释成  $10^1 \sim 10^9$  的标准浓度作为 qPCR 标准曲线。通过琼脂糖凝胶电泳检查荧光定量 PCR 扩增产物的特异性。

本实验和已报道研究<sup>[27]</sup>均发现目前已知的 comammox 的 *amoA* 基因 PCR 引物易导致非特异性扩增, 致使 *amoA* 基因丰度高估。因此利用凝胶电泳半定量法对 qPCR 结果进行数值初步矫正。即通过 1.2% 凝胶电泳和 Bio-Rad 公司的 Quantity one

v4.6.6 软件检测待测样品 qPCR 产生的目标条带和非目标的相对灰度值, 从而计算目标条带占泳道中总灰度值的百分比, 进而用该百分比乘以 qPCR 检测结果, 即得到样品中 comammox 的 *amoA* 基因实际拷贝数。同时我们将进一步用宏基因组中 AOA、AOB 和 comammox 三种 *amoA* 基因相对丰度, 以及 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因的 qPCR 结果, 进一步进行计算验证 (见 1.5)。

表 1 定量 PCR 扩增引物及反应条件

Table 1 Quantitative PCR amplification primers and their reaction conditions

目标基因 Target gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences (5'-3')	片段长度 Length of amplicons	定量 PCR 反应程序 Thermal profile for qPCR	参考文献 Reference
氨氧化古菌 <i>amoA</i>	Arch-amoAF	STA ATG GTC TGG CTT AGA CG	639 bp	95 °C 预变性 3 min, 38 个循环 (95 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 在 83 °C 下读板); 溶解曲线: 在 65~95 °C, 每增加 0.5 °C, 保持 5 s 读取荧光值	[24]
AOA <i>amoA</i>	Arch-amoAR	GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT			
氨氧化细菌 <i>amoA</i>	amoA1F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	491 bp	95 °C 预变性 3 min, 38 个循环 (95 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 在 83 °C 下读板); 溶解曲线: 在 65~95 °C, 每增加 0.5 °C, 保持 5 s 读取荧光值	[25]
AOB <i>amoA</i>	amoA2R	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC			
完全硝化细菌 <i>amoA</i>	Ntsp-amoA-162F	GGA TTT CTG GNT SGA TTG GA	198 bp	95 °C 预变性 3 min, 38 个循环 (95 °C 变性 10 s, 48 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s); 溶解曲线: 在 70~95 °C, 每增加 0.2 °C, 保持 5 s 读取荧光值	[26]
Comammox <i>amoA</i>	Ntsp-amoA-359R	WAG TTN GAC CAC CAS TAC CA			
完全硝化细菌分支 A <i>amoA</i>	comaA-244F		415 bp	95 °C 预变性 3 min, 38 个循环 (95 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 在 72 °C 下读板); 溶解曲线: 在 38~96 °C, 每增加 0.5 °C, 保持 5 s 读取荧光值	[22]
Comammox Clade A <i>amoA</i>	comaA-659R	该引物为简并引物, 前 后端引物各由 6 条序列 混合组成	415 bp		
完全硝化细菌分支 B <i>amoA</i>	comaB-244F		415 bp		
Comammox Clade B <i>amoA</i>	comaB-659R				

## 1.5 宏基因组测序和功能基因拼接及其相对丰度计算

委托上海美吉生物对土壤总 DNA 进行 150 bp 双端测序 (Illumina HiSeq 2 000)。每个样品分别产生约 48Gb 的原始数据, 然后通过 SeqPrep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>) 去除末端测序接头

(adaptor), 然后利用 Sickle (<https://github.com/najoshi/sickle>) 以默认参数对原始序列进行了质量控制和过滤, 三个样品分别得到约 42G bp 高质量数据。使用 metaSPAdes (version 3.10) 宏基因组拼接软件对测序数据进行 *de novo* 从头组装, *k-mer* 参数设置为 21~53。使用 Glimmer 3.0 进行开放阅读框

(ORFs) 预测。以 NCycDB 数据库<sup>[28]</sup>中 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因以及 Pjevac<sup>[22]</sup>、Daims<sup>[6]</sup>和 Li<sup>[29]</sup>等文章中的 comammox 的 *amoA* 基因为参考序列, 利用 BLASTX 与宏基因组拼接片段进行比对, 提取  $E$  value  $\leq 10^{-5}$  且同源性高于 70% 的 contigs 作为 *amoA* 的候选序列, 并进一步通过 NCBI 的 nr 数据库注释以及构建 *amoA* 进化树等手段进行验证去除错误注释的 *amoA* 基因序列。

分别采用两种方法计算宏基因组中 AOA、AOB 和 comammox 的 *amoA* 基因相对丰度。第一种方法, 基于 Mapped 到 *amoA* 基因的 HiSeq reads 数统计。第二种方法, 统计宏基因组中参与三种 *amoA* contigs 拼接所用的 HiSeq reads 数, reads 数高低反映了该类基因的相对丰度高。即根据 *amoA* 基因参考序列, 通过 BLASTX 与原始 reads 进行比对, 统计其中  $E$  value  $\leq 10^{-5}$ , 同源性  $\geq 70\%$ , blast hit 区域大于 25 个氨基酸长度的 reads 数目, 通过比较三种 *amoA* 基因 mapping 的 reads 总数, 确定三者间的相对丰度。

## 1.6 系统发育进化树构建

首先通过 MOTHUR 软件<sup>[30]</sup>按照 95% 序列同源性提取 AOA、AOB 和 comammox 的 *amoA* 基因的 OTUs

(operational taxonomic unit) 代表性序列, 然后利用 MEGA 7.0 软件的最大似然法 (Maximum likelihood) 构建三种氨氧化微生物 *amoA* 基因的进化树。

## 2 结果

### 2.1 AOA、AOB 和 comammox *amoA* 基因丰度

qPCR 结果显示酸性马尾松林土壤中 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因丰度分别为  $2.61 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> 和  $1.45 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> (图 1a)。基于引物 Ntsp-amoA-162F/359R 和引物 comaA/B-244F/659R 的 qPCR 结果显示 comammox *amoA* 基因拷贝数分别为  $4.14 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> 和  $2.64 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup>。然而, 凝胶电泳图显示两组引物的 qPCR 结果均有明显的非特异性扩增, 导致 comammox 的 *amoA* 基因 qPCR 结果的高估 (图 1a)。通过凝胶电泳和 Quantity one v4.6.6 对 comammox 的 *amoA* 基因目标条带进行半定量估算后, 得到两种引物扩增的 comammox *amoA* 基因总拷贝数分别为  $1.38 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> 和  $1.47 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> (图 1a)。因此, 氨氧化微生物功能基因 *amoA* 的相对丰度, comammox: AOA 为 0.53~0.56; comammox: AOB 为 0.95~1.01 (图 1a)。

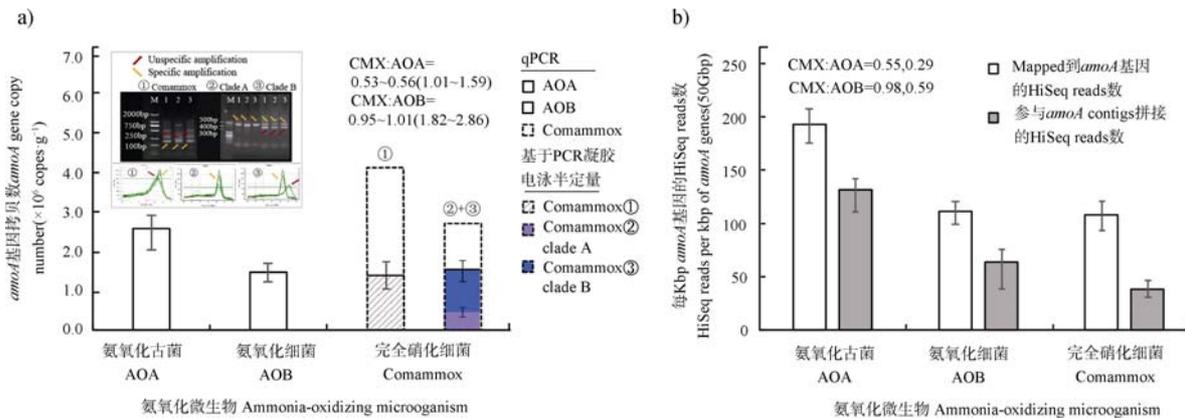


图 1 基于荧光定量 PCR 和凝胶电泳半定量 (a) 以及宏基因组数据 (b) 的 AOA、AOB 和 comammox 的 *amoA* 基因丰度  
Fig. 1 *amoA* gene abundance of AOA, AOB and comammox based on qPCR, agarose gel electrophoresis semi-quantitative analysis (a) and metagenomic data (b)

基于宏基因组 Mapped 到 *amoA* 基因的 HiSeq reads 数目和参与 *amoA* contigs 拼接的 HiSeq reads 数目分析发现, 三类氨氧化微生物 *amoA* 基因相对丰度为: comammox: AOA 约为 0.55 和 0.29, comammox: AOB 约为 0.98 和 0.59 (图 1b)。

### 2.2 AOA、AOB 和 comammox 的系统发育和群落组成

目前 AOA 主要包括 *Nitrosopumilus* (group 1.1a)、*Nitrosotalea* (group 1.1a-associated)、*Nitrososphaera* (group 1.1b) 和 *Nitrosocaldus* (ThAOA)<sup>[31]</sup>。宏基因

组分析发现,马尾松林 AOA 其主要类群为 group 1.1b, 约占 AOA 总丰度的 85.66%~88.07%, 其次为 group 1.1a-associated, 占 11.93%~14.34%, 未检测到 group 1.1a 和 *Nitrosocaldus* 类群 (图 2)。

AOB 主要分为  $\beta$ -AOB (*Nitrospira* 和 *Nitrosomonas*) 和  $\gamma$ -AOB (*Nitrosococcus*, 亚硝化球菌属) [32]。其中 *Nitrospira* 包含 cluster 1~4、cluster 0、*Nitrospira* sp. Nsp65 和 *Nitrospira* sp. Nsp57/58 等分支 [33-34]。*Nitrosomonas* 包含 *N. europaea*/*N. mobilis*、*N. communis*、*N. marina*、*N. oligotropha*、*N. cryotolerans*、*Nitrosomonas* sp. Nm143 和 cluster 5 等分支 [35]。宏基因组分析显示, *Nitrospira* 是 AOB 的主要类群, 占 AOB

*amoA* 基因总丰度的 51.71%~63.96%, 主要隶属于 cluster 3、0 和 *Nitrospira*-like (图 3), 而 *Nitrosomonas* 占 36.04%~48.29%, 主要隶属于 *Nitrosomonas communis* 和 *Nitrosomonas oligotropha* (图 3)。

目前报道的 comammox 均来源于 *Nitrospira* lineage II, 且主要分为 clade A 和 clade B 两支 [6-7], 近期有研究将 comammox clade A 进一步分为两个单系群, clade A.1 和 clade A.2 [36]。土壤宏基因组分析发现, 酸性森林土壤中 comammox 的主要类群为 clade B, 占 comammox *amoA* 基因总丰度的 63.39%~71.39%, 此外 clade A.1 占总序列数的 28.61%~36.61%, 未检测到 clade A.2 序列 (图 4)。

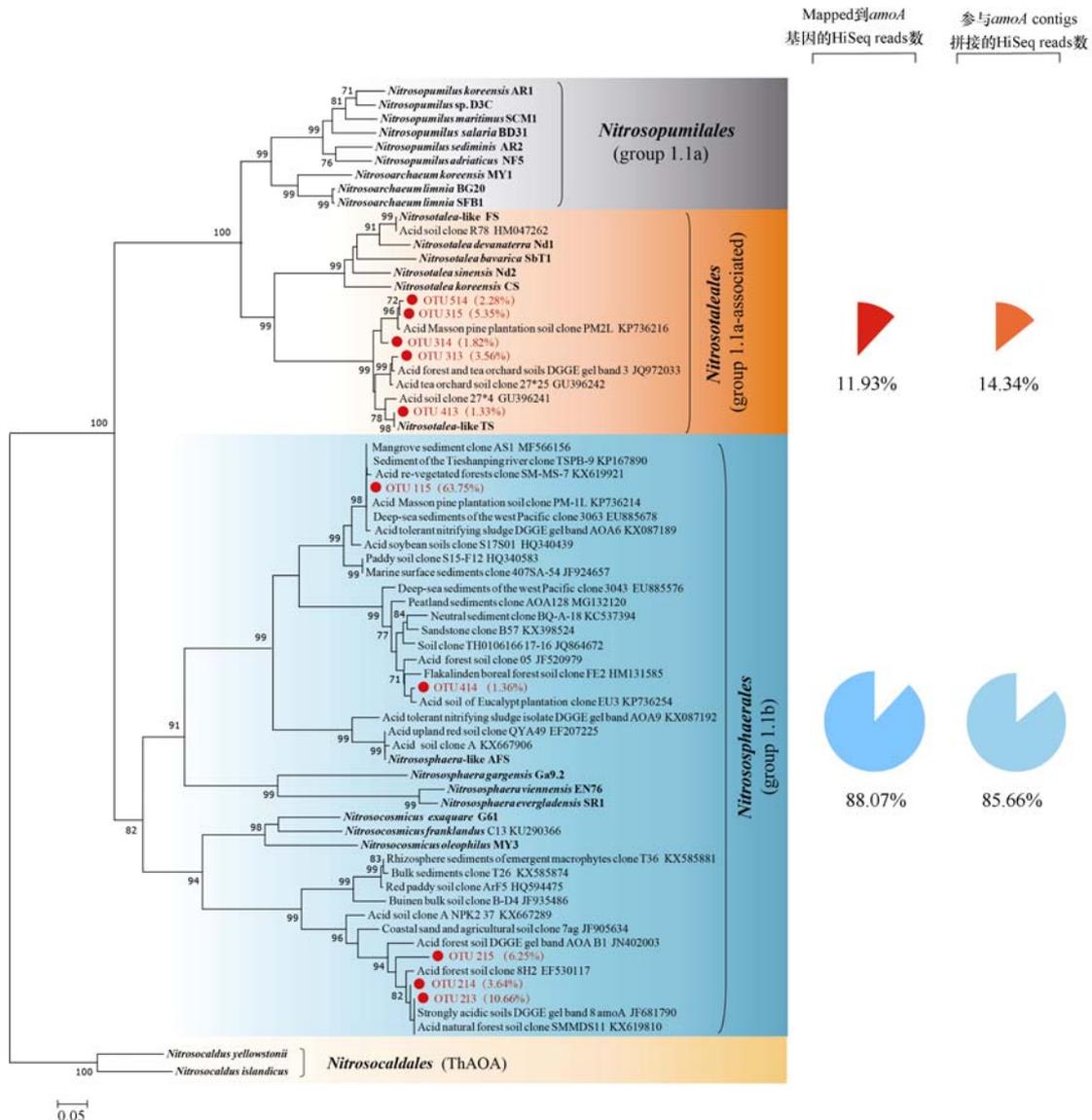
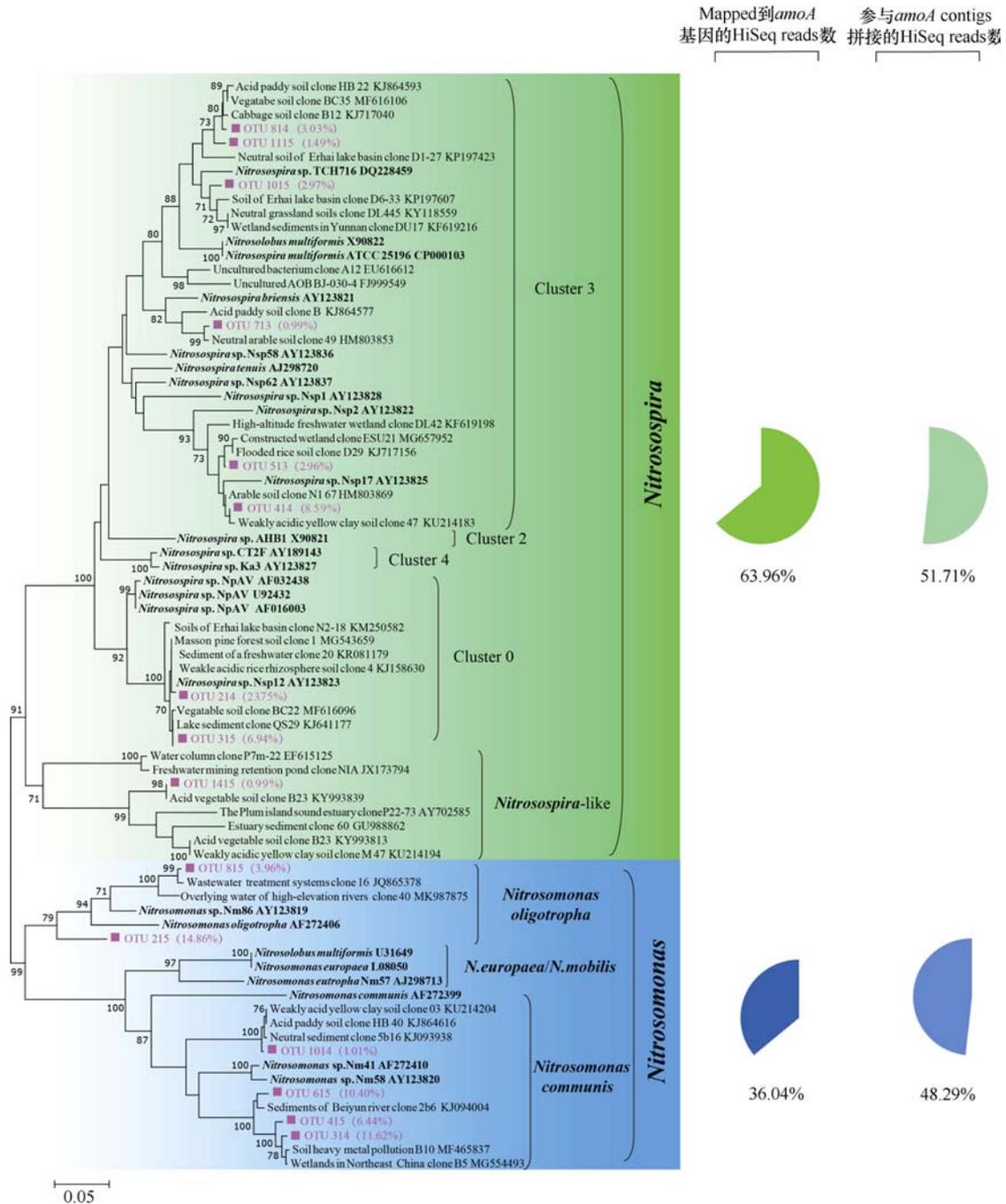


图 2 基于宏基因组的氨氧化古菌 (AOA) *amoA* 基因系统发育树和相对丰度

Fig. 2 Phylogenetic tree and relative abundance of AOA *amoA* genes in the forest soil based on metagenomic analysis

图3 基于宏基因组的氨氧化细菌 (AOB) *amoA* 基因系统发育树和相对丰度Fig. 3 Phylogenetic tree and relative abundance of AOB *amoA* genes in the forest soil based on metagenomic analysis

### 3 讨论

马尾松林土壤属于典型酸性森林土壤。为了得到 AOA、AOB 和 comammox *amoA* 基因准确丰度, 本研究同时使用了 qPCR、凝胶电泳半定量和宏基因组三种方法进行数据比较分析。qPCR 和宏基因组均表明 AOA *amoA* 基因丰度约为 AOB *amoA* 基因的两

倍 (图 1)。而 comammox *amoA* 基因的两套引物存在明显的非特异扩增, 该结果与 Beach 和 Noguera<sup>[27]</sup> 研究结果一致 (图 1a)。通过凝胶电泳半定量对 qPCR 结果进行矫正以及宏基因组测序分析都发现, comammox *amoA* 基因拷贝数和 AOB 的 *amoA* 基因处于同一个水平, 均为 AOA *amoA* 基因拷贝数的 50% 左右 (图 1)。然而, 目前 comammox 的 qPCR

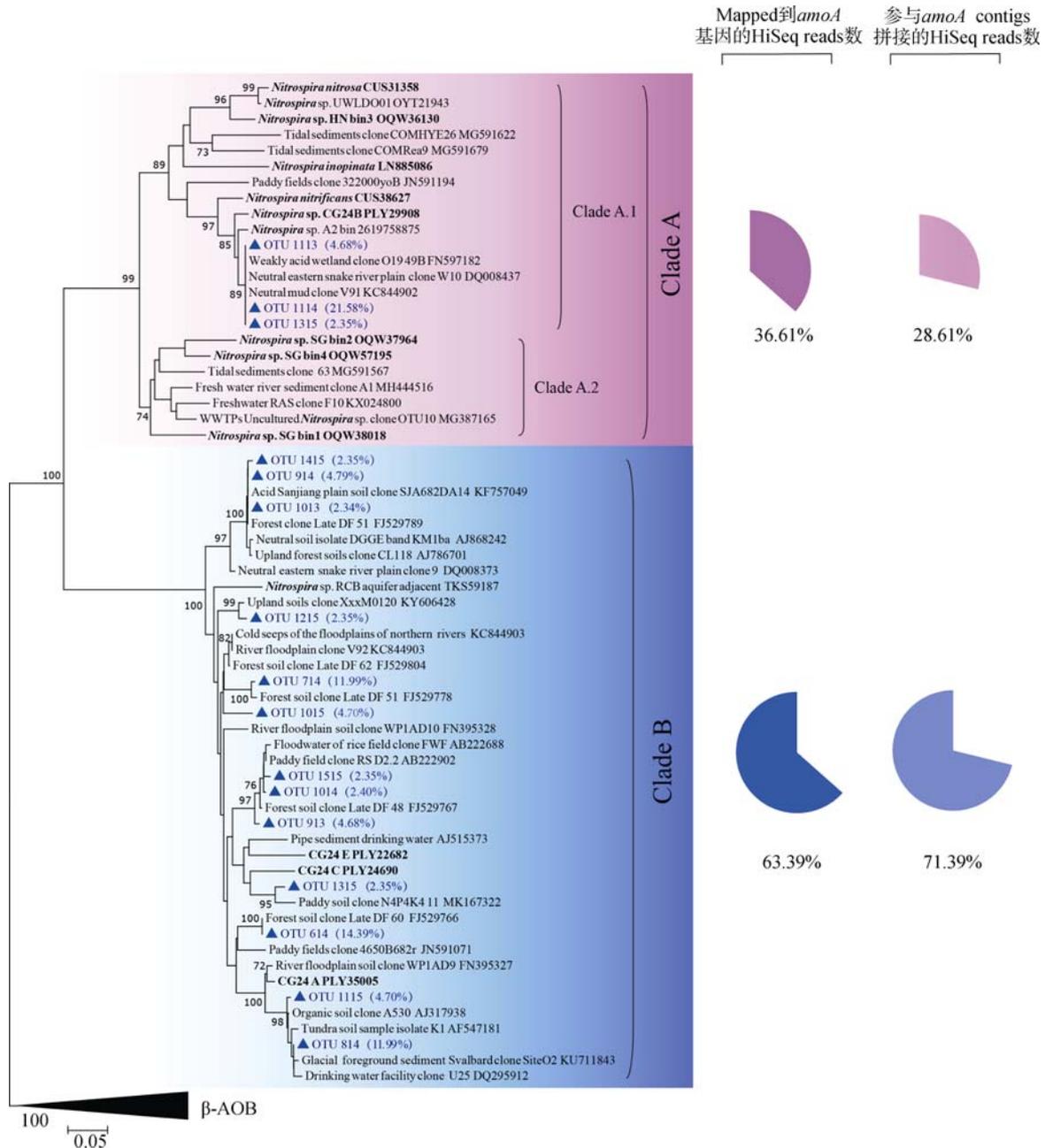


图 4 基于宏基因组的完全硝化微生物 (comammox) *amoA* 基因系统发育树和相对丰度

Fig. 4 Phylogenetic tree and relative abundance of comammox *amoA* genes in the forest soil based on metagenomic analysis

定量仍处于起步阶段。而凝胶电泳半定量也存在一定缺陷,其反映是 qPCR 结束时目标电泳条带和非目标电泳条带的灰度值之比,无法真正反映 qPCR 反应过程中特异扩增和非特异扩增释放的荧光信号强度之比。此外,凝胶电泳半定量目标条带位置,仍可能包含非特异扩增的序列。而宏基因组技术目前成本较高,数据分析也较繁琐。因此,仍需进一步发展 comammox *amoA* 基因 qPCR 更有效的引物,或选择 comammox 基因组中其他 marker 基因设计

qPCR 引物。

pH 和  $\text{NH}_3$  浓度是影响酸性土壤氨氧化微生物群落最重要的两个环境因子。自首株严格嗜酸 AOA 菌株分离以来<sup>[8]</sup>,大量基于 DNA-SIP 实验证据表明 group 1.1a-associated AOA 主导了很多酸性土壤的氨氧化过程<sup>[9, 11, 37]</sup>。然而我们发现 group 1.1b AOA 也可以在某些酸性土壤中发挥着主导作用<sup>[13]</sup>。James I. Prosser 团队<sup>[38-39]</sup>通过全球、区域和田块三个尺度研究发现 group 1.1b AOA 也存在于酸性土壤中,且亚

枝 cluster 11 被认为嗜酸生长。本研究发现马尾松林土壤中 group 1.1b AOA 占据数量上的优势, 而 group 1.1a associated 仅占 12% (图 2)。此外, 酸性土壤中  $\text{NH}_3$  而被大量离子化成  $\text{NH}_4^+$ , 而目前认为氨氧化微生物的底物为氨分子而非铵离子<sup>[40]</sup>, 因此推测酸性土壤中 group 1.1b AOA 能够适应较低氨环境。

酸性土壤中 AOB 的贡献长期以来一直存在较大争议。在 AOA 发现前, 一直认为 AOB 驱动了酸性土壤的氨氧化过程。但后来发现分离于酸性土壤的 *Nitrosospira* 和 *Nitrosomonas* 纯菌株都不能在实验室内的酸性 pH 条件下生长<sup>[16]</sup>。Prosser 等<sup>[16-17]</sup>推测可能有三种原因: (1) 土壤中存在微域中性或碱性 pH 环境; (2) AOB 在土壤中形成生物膜或团聚体抵抗酸性 pH; (3) 很多 AOB 菌株具有尿素水解酶活性, 能够通过利用尿素抵抗 (酸性土壤中) 低氨胁迫。我们认为第三种解释可能混淆了酸性 pH 和低氨浓度两种环境胁迫, 通过利用尿素确实可以应对低氨寡营养胁迫, 但该 AOB 菌株能够在酸性 pH 条件下生存, 还必须同时能够抵抗低 pH 胁迫。推测 James I. Prosser 等当时实验选择的 *Nitrosospira* 纯菌株本身能够耐受酸性 pH, 它只需要在此基础上通过利用尿素应对低氨胁迫即可在酸性 pH 培养基中生长。这点可以通过 Prosser 等<sup>[16-17]</sup>两篇文章中推测出来, 五株来源于酸性土壤的 AOB 纯菌株均可以利用尿素, 但只有一株 *Nitrosospira* 菌株可以通过利用尿素在酸性 pH 培养基中生长。因此, 利用尿素对以上来源于酸性土壤的五株 AOB 纯菌株来说是适应酸性 pH 的必要但非充分条件。2017 年 Hayatsu 等<sup>[21]</sup>分离得到在不添加尿素条件下, 能够在酸性 pH 中生长的 AOB 纯菌株  $\gamma$ -proteobacterium TAO100。然而目前  $\beta$ -proteobacterium AOB 适应酸性土壤的分子生物学机制仍不清楚。

作为最新发现的 comammox, 其在地球各个生境中的分布规律备受关注。目前发现 comammox 在土壤、沉积物、滩涂、植物叶表、地下水、饮用水以及废水处理系统均有分布<sup>[6-7, 22, 36]</sup>。本研究发现酸性森林土壤也存在丰度与 AOB (每个 AOB 细胞平均含有 1.5 个拷贝的 *amoA* 基因) 相当的 comammox 类群 (图 1), 其中 clade B 占 comammox 总类群的 64%, 而 clade A 约占 36%。该结果和已报到森林土壤中 comammox 群落组成基本一致<sup>[22, 36]</sup>。

不同的是, Xia 等<sup>[36]</sup>发现森林土壤中 clade A 主要隶属于 clade A.2 分支, 而本研究发现马尾松林土壤中 clade A 主要隶属于 clade A.1 (图 4)。以上数据暗示 comammox 无论在 clade B 还是 clade A 类群中都存在能够适应酸性土壤环境的物种。Michael Wagner 课题组<sup>[41]</sup>继 2015 年发现第一株 comammox 纯菌株后, 也明确了已知的 comammox 纯菌株对底物氨具有很高的亲和力, 其亲和力高于所有已知 AOB 菌株和绝大部分土壤来源的 AOA 菌株, 因此这可以从一定程度解释 comammox 如何适应酸性土壤中的低  $\text{NH}_3$  胁迫。然而, comammox 如何适应酸性 pH 胁迫仍不清楚。

## 4 结 论

本文利用 qPCR、凝胶电泳半定量和宏基因组测序等技术研究酸性森林土壤氨氧化微生物的群落结构。qPCR 显示 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因丰度为  $2.61 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> 和  $1.45 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup>。而 comammox *amoA* 基因的扩增引物产生明显的非特异性扩增, 导致 qPCR 结果的高估。半定量和宏基因组分析发现, 氨氧化微生物 *amoA* 基因相对丰度为: comammox: AOA=0.55, comammox: AOB=0.98, 推算 comammox *amoA* 基因真实丰度为 (1.38~1.47)  $\times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup>。此外, AOA 主要类群为 group 1.1b 占其总丰度的 88.07%, 而经典嗜酸类群 group 1.1a-associated 仅占 11.93%。AOB 主要类群为 *Nitrosospira* (63.96%), 而 *Nitrosomonas* 为 36.04%。comammox 主要类群为 clade B (63.39%), 而 clade A 仅占 36.61%且均隶属于 clade A.1 亚枝。

**致 谢** 感谢浙江农林大学孙凯和张云晴等同学在样品采集和理化性质测试中给予的帮助!

## 参考文献 (References)

- [1] He J Z, Shen J P, Zhang L M, et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9): 2364—2374.
- [2] Rennenberg H, Dannenmann M, Gessler A, et al. Nitrogen balance in forest soils: Nutritional limitation of

- plants under climate change stresses[J]. *Plant Biology*, 2009, 11: 4—23.
- [ 3 ] Winogradsky S. Contributions a la morphologie des organismes de la nitrification. *Arkiv Biologischeski Nauk* ( St. Petersburg ), 1892, 1: 87—137
- [ 4 ] Gubry-Rangin C, Nicol G W, Prosser J I. Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 74 ( 3 ): 566—574.
- [ 5 ] Könneke M, Bernhard A E, de la Torre J R, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon[J]. *Nature*, 2005, 437 ( 7058 ): 543—546.
- [ 6 ] Daims H, Lebedeva E V, Pjevac P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria[J]. *Nature*, 2015, 528 ( 7583 ): 504—509.
- [ 7 ] van Kessel M A H J, Speth D R, Albertsen M, et al. Complete nitrification by a single microorganism[J]. *Nature*, 2015, 528 ( 7583 ): 555—559.
- [ 8 ] Lehtovirta-Morley L E, Stoecker K, Vilcinskas A, et al. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 ( 38 ): 15892—15897.
- [ 9 ] Zhang L M, Hu H W, Shen J P, et al. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6 ( 5 ): 1032—1045.
- [ 10 ] He J Z, Hu H W, Zhang L M. Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2012, 55: 146—154.
- [ 11 ] Lu, Han W Y, Zhang J B, et al. Nitrification of archaeal ammonia oxidizers in acid soils is supported by hydrolysis of urea[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6 ( 10 ): 1978—1984.
- [ 12 ] Wang B Z, Qin W, Ren Y, et al. Expansion of Thaumarchaeota habitat range is correlated with horizontal transfer of ATPase operons[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13 ( 12 ): 3067—3079.
- [ 13 ] Wang B Z, Zheng Y, Huang R, et al. Active ammonia oxidizers in an acidic soil are phylogenetically closely related to neutrophilic archaeon[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80 ( 5 ): 1684—1691.
- [ 14 ] Stempfhuber B, Engel M, Fischer D, et al. pH as a driver for ammonia-oxidizing archaea in forest soils[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 69 ( 4 ): 879—883.
- [ 15 ] Wu R N, Meng H, Wang Y F, et al. A more comprehensive community of ammonia-oxidizing archaea ( AOA ) revealed by genomic DNA and RNA analyses of *amoA* gene in subtropical acidic forest soils[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 74 ( 4 ): 910—922.
- [ 16 ] Allison S M, Prosser J I. Urease activity in neutrophilic autotrophic ammonia-oxidizing bacteria isolated from acid soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1991, 23 ( 1 ): 45—51.
- [ 17 ] Burton S A Q, Prosser J I. Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 ( 7 ): 2952—2957.
- [ 18 ] Mintie A T, Heichen R S, Cromack K Jr, et al. Ammonia-oxidizing bacteria along meadow-to-forest transects in the Oregon Cascade Mountains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 ( 6 ): 3129—3136.
- [ 19 ] Long X E, Chen C R, Xu Z H, et al. Abundance and community structure of ammonia oxidizing bacteria and Archaea in a Sweden boreal forest soil under 19-year fertilization and 12-year warming[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2012, 12 ( 7 ): 1124—1133.
- [ 20 ] Hastings R C, Butler C, Singleton I, et al. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria populations in acid forest soil during conditions of moisture limitation[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 30 ( 1 ): 14—18.
- [ 21 ] Hayatsu M, Tago K, Uchiyama I, et al. An acid-tolerant ammonia-oxidizing  $\gamma$ -proteobacterium from soil[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11 ( 5 ): 1130—1141.
- [ 22 ] Pjevac P, Schaubberger C, Poghosyan L, et al. *AmoA*-targeted polymerase chain reaction primers for the specific detection and quantification of comammox *Nitrospira* in the environment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1508. DOI: <https://doi.org/10.1101/096891>.
- [ 23 ] Zhang K R, Liu Y D, Zhu X W, et al. Community types and species diversity of *Pinus massoniana* forests of Yuelu Mountain, Changsha[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2011, 47 ( 4 ): 86—94. [张克荣, 刘应迪, 朱晓文, 等. 长沙岳麓山马尾松林的群落类型划分及物种多样性分析[J]. *林业科学*, 2011, 47 ( 4 ): 86—94.]
- [ 24 ] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 ( 41 ): 14683—14688.
- [ 25 ] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 ( 12 ): 4704—4712.
- [ 26 ] Fowler S J, Palomo A, Dechesne A, et al. Comammox *Nitrospira* are abundant ammonia oxidizers in diverse groundwater-fed rapid sand filter communities[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20 ( 3 ): 1002—1015.

- [ 27 ] Beach N K, Noguera D R. Design and assessment of species-level qPCR primers targeting comammox[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 36. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00036>.
- [ 28 ] Tu Q C, Lin L, Cheng L, et al. NCycDB: A curated integrative database for fast and accurate metagenomic profiling of nitrogen cycling genes[J]. *Bioinformatics*, 2019, 35 ( 6 ): 1040—1048.
- [ 29 ] Li C Y, Hu H W, Chen Q L, et al. Comammox *Nitrospira* play an active role in nitrification of agricultural soils amended with nitrogen fertilizers[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2019, 138: 107609.
- [ 30 ] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur : Open-source , platform-independent , community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 ( 23 ): 7537—7541.
- [ 31 ] Pester M, Rattei T, Flechl S, et al. *AmoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14 ( 2 ): 525—539.
- [ 32 ] Head I M, Hiorns W D, Embley T M, et al. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. *Journal of General Microbiology*, 1993, 139 ( 6 ): 1147—1153.
- [ 33 ] Stephen J R, McCaig A E, Smith Z, et al. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 ( 11 ): 4147—4154.
- [ 34 ] Kowalchuk G A, Stephen J R, de Boer W, et al. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 ( 4 ): 1489—1497.
- [ 35 ] Prosser J I, Head I M, Stein L Y. The family *Nitrosomonadaceae*[M]//The prokaryotes. Berlin , Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014: 901—918.
- [ 36 ] Xia F, Wang J G, Zhu T, et al. Ubiquity and diversity of complete ammonia oxidizers ( comammox ) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84 ( 24 ): e01390-18. <https://doi.org/10.1128/aem.01390-18>.
- [ 37 ] Lu, Jia Z J. Urease gene-containing Archaea dominate autotrophic ammonia oxidation in two acid soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15( 6 ): 1795—1809.
- [ 38 ] Gubry-Rangin C, Hai B, Quince C, et al. Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 ( 52 ): 21206—21211.
- [ 39 ] Gubry-Rangin C, Kratsch C, Williams T A, et al. Coupling of diversification and pH adaptation during the evolution of terrestrial Thaumarchaeota[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112 ( 30 ): 9370—9375.
- [ 40 ] Stahl D A, de la Torre J R. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing Archaea[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66 ( 1 ): 83—101.
- [ 41 ] Kits K D, Sedlacek C J, Lebedeva E V, et al. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle[J]. *Nature*, 2017, 549 ( 7671 ): 269—272.

( 责任编辑：卢 萍 )