

DOI: 10.11766/trxb202101050577

潘红, 李勇, 孟春梅, 郑燕, 刘杏梅, 诸葛玉平, 贾仲君, 邸洪杰, 徐建明. 氮素水平对土壤甲烷氧化和硝化微生物相互作用的影响[J]. 土壤学报, 2022, 59(2): 557-567.

PAN Hong, LI Yong, MENG Chunmei, ZHENG Yan, LIU Xingmei, ZHUGE Yuping, JIA Zhongjun, DI Hongjie, XU Jianming. Effects of Nitrogen Levels on Interactions between Active Methanotrophs and Nitrifiers[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(2): 557-567.

氮素水平对土壤甲烷氧化和硝化微生物相互作用的影响*

潘红^{1,2}, 李勇^{1†}, 孟春梅¹, 郑燕³, 刘杏梅¹, 诸葛玉平², 贾仲君⁴,
邸洪杰¹, 徐建明¹

(1. 浙江省农业资源与环境重点实验室, 浙江大学环境与资源学院, 杭州 310058; 2. 土肥高效利用国家工程研究中心, 山东农业大学资源与环境学院, 山东泰安 271018; 3. 郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 郑州 450002; 4. 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008)

摘要: 甲烷氧化微生物和氨氧化微生物均是既可以氧化甲烷(CH₄)又可以氧化氨(NH₃), 氨氧化是硝化作用的限速步骤, 也是好氧土壤氧化亚氮(N₂O)排放的主要生物路径。选取内蒙古草原围封禁牧土壤为研究对象, 利用稳定同位素核酸探针技术(DNA-SIP)探讨不同氮水平下土壤活性甲烷氧化微生物与硝化微生物及其相互作用机制。结果发现低氮添加促进甲烷氧化活性, 而高氮添加抑制甲烷氧化活性; 低氮和高氮添加均显著增强硝化活性。基于 DNA-SIP 的高通量测序结果发现 *Methylobacter* MOB 和 *Nitrosospira* AOB/*Nitrosospira* NOB 分别是该土壤的主要活性甲烷氧化和硝化微生物。网络结构分析发现 *Methylobacter* MOB 和 *Nitrosospira* AOB/*Nitrosospira* NOB 存在显著负相关关系, 进一步证明活性甲烷氧化和硝化微生物之间存在竞争性相互作用。以上结果表明, 氮素水平影响草原土壤甲烷氧化和硝化微生物的相互作用, 研究结果为采取措施调控草原土壤 CH₄ 的汇和 N₂O 的源功能以及减缓气候变暖的进程提供理论基础。

关键词: 氮素水平; 甲烷氧化; 硝化作用; 氨氧化细菌; 甲烷氧化细菌; 微生物相互作用; 草原土壤

中图分类号: S154.36 文献标志码: A

Effects of Nitrogen Levels on Interactions between Active Methanotrophs and Nitrifiers

PAN Hong^{1,2}, LI Yong^{1†}, MENG Chunmei¹, ZHENG Yan³, LIU Xingmei¹, ZHUGE Yuping², JIA Zhongjun⁴,
DI Hongjie¹, XU Jianming¹

(1. College of Environmental and Resource Sciences, Provincial Key Laboratory of Agricultural Resources and Environment, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. National Engineering Research Center for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources, College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 3. College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China; 4. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

* 国家重点研发计划项目(2016YFD0200302)、国家自然科学基金项目(41907026)和中国博士后科学基金项目(2020T130387, 2019M652448)资助 Supported by the National Key R&D Program of China (No. 2016YFD0200302), the National Natural Science Foundation of China (No. 41907026), and the China Postdoctoral Science Foundation (Nos. 2020T130387, 2019M652448)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: liyongcn@zju.edu.cn

作者简介: 潘红(1990—), 女, 山东泰安人, 副教授, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: panhong6239@163.com

收稿日期: 2021-01-05; 收到修改日期: 2021-03-24; 网络首发日期(www.cnki.net): 2021-05-10

Abstract: 【Objective】 Ammonia oxidation is the limited step of nitrification and it is the main microbial pathway of N_2O emissions in aerobic soils. Grassland soils are sinks for CH_4 and sources of N_2O . However, the mechanisms of the interactions between methane and ammonia oxidation under various N levels in grassland soils remain elusive. 【Method】 A microcosm experiment was implemented using Inner Mongolia grassland soils based on DNA-Stable-Isotope-Probing (DNA-SIP), and the methane and ammonia oxidation under various N levels was studied. 【Result】 The results showed that methane-oxidizing activity was stimulated by low N while it was suppressed by high N application. Contrarily, the nitrification activity was stimulated by both low and high N addition. The *Methylobacter* lineage of methane-oxidizing bacteria(MOB) were the active players in methane oxidation, while nitrifying communities dominated by *Nitrosospira* lineage of AOB and *Nitrosospira*-like nitrite-oxidizing bacteria (NOB) were the active players in nitrification. Also, the network analysis unraveled significant negative relationships between active *Methylobacter* MOB and *Nitrosospira* AOB/*Nitrosospira* NOB, which suggested competitive interactions between active methanotrophs and nitrifiers in grassland soils. 【Conclusion】 The interactions between active methanotrophs and nitrifiers can be affected by N levels. Our results provide theoretical support for regulating CH_4 sinks and N_2O sources of grassland soils and for greenhouse gas mitigation.

Key words: Nitrogen levels; Methane oxidation; Nitrification; AOB; MOB; Microbial interaction; Grassland soils

甲烷 (CH_4) 和氧化亚氮 (N_2O) 是两种重要的温室气体, 其全球增温潜势分别是二氧化碳 (CO_2) 的 28 倍~34 倍和 265 倍~298 倍^[1-2]。旱地土壤(森林土壤、草原土壤等)是大气甲烷的有效汇, 因其具有能够氧化大气浓度甲烷的高亲和力甲烷氧化单加氧酶 (MMO)^[3]。好氧土壤中, N_2O 的主要产生途径是有氧硝化作用。氨氧化过程是有氧硝化的第一步, 也是限速步骤, 主要由具有氨单加氧酶 (AMO) 的氨氧化古菌 (AOA) 和氨氧化细菌 (AOB) 完成。研究发现, MMO 在进化上和 AMO 密切相关, 它们有高度相似的氨基酸序列、相似的蛋白复合体结构、相似结构的底物 (CH_4 和 NH_3)、相似的被抑制特性和相似的生态位, 而且都竞争 N 源^[4]。甲烷氧化细菌 (MOB) 的生长繁殖需要氮源, 但其自身不具备固氮能力, 因此, MOB 需要获取外源氮源。鉴于以上研究背景, 甲烷氧化和硝化过程有着必然的内在联系^[5]。

草原生态系统是世界上最大的陆地生态系统, 草地面积占我国国土面积的 41%^[6]。草原土壤既是 CH_4 的汇, 又是 N_2O 的源, 因此, 有关草原生态系统中土壤的碳氮循环一直是研究热点问题。当前关于草原土壤系统中硝化过程和甲烷氧化过程的研究发现, *Nitrosospira* AOB 和 *Methylobacter* MOB 分布广泛, 在多种草原土壤生境中参与硝化和甲烷氧化过程^[7-8]。旱地土壤类群 (USC) MOB 因其具有高甲烷亲和力在草原土壤中的重要性逐渐被发现^[9-10]。但目前关于草原土壤中不同氮水平下甲烷氧化活性和相

关活性微生物, 以及甲烷氧化和硝化之间复杂的相互作用关系机制的研究较少^[11-12]。因此本研究选取内蒙古锡林郭勒盟草原土壤为研究对象, 结合稳定同位素核酸探针 (DNA-SIP)、实时荧光定量 PCR 和 Miseq 测序等分子生物学技术, 分析不同氮水平下, 甲烷氧化和硝化微生物的相互关系, 阐明草原生态系统 CH_4 氧化和硝化的交互作用机制, 以期为深入了解草原土壤碳氮循环、提高草原氮肥利用率、增强草原生产力、实现温室气体减排提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品概况

土壤样品采自位于内蒙古锡林郭勒盟草原 ($43^{\circ}26'—44^{\circ}39'N$, $115^{\circ}32'—117^{\circ}12'E$) 的中国科学院内蒙古草原生态系统定位研究站。该地区冬季寒冷, 夏季凉爽, 属于半干旱大陆性季风气候, 每年大约 102~136 d 无霜期, 全年平均气温 $-0.4^{\circ}C$, 年均降水量 350 mm 左右, 降雨多发生在六月至八月, 雨热同期, 季节分布不均, 与植物生长期一致。主要植被类型包括羊草 (*Leymus chinensis*)、大针茅 (*Stipa grandis*) 和粗隐子草 (*Cleistogenes squarrosa*)。土壤类型为暗栗钙土。该样地 1996 年以前自由放牧, 自 1996 年起禁牧围封。样地大小为 $400\text{ m} \times 60\text{ m}$, 包括 5 个小区, 每个小区 $70\text{ m} \times 60\text{ m}$, 相邻的两个小区之间有 10 m 的缓冲带便于取样。2016 年 8 月用 5 cm 直径土钻按照“S”型取样法采

集 0~20 cm 表层土, 全部混匀, 研磨过 2 mm 筛。土壤基本理化性质如下: pH 7.22, 容重 $1.32 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 有机质 $25.47 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 全碳 $16.67 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 全氮 $1.50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 硝态氮 $63.36 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 铵态氮 $4.45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 有效磷 (Olsen P) $7.31 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 速效钾 $251.10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

1.2 微宇宙培养实验

将相当于 6.0 g 干重的新鲜土壤样品转移至 120 mL 血清瓶, 调节 40% 田间持水量, 胶塞加铝盖封口, 25 °C 黑暗中预培养, 每周监测 CO_2 浓度, 当浓度降至 $5000 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 时开始正式培养。

正式培养实验共设 7 个处理, 如表 1 所示, 每个处理 3 个重复。 $^{13}\text{CH}_4$ 处理 (99 atom% ^{13}C , Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 用以分析甲烷氧化活性和活性甲烷氧化微生物; $^{13}\text{CO}_2$ +Urea (99 atom% ^{13}C , 上海稳定性同位素工程技术研究中心, 上海, 中国) 处理用以分析硝化活性和活性硝化微生物; $^{13}\text{CH}_4$ + $^{13}\text{CO}_2$ +Urea 和 $^{12}\text{CH}_4$ + $^{12}\text{CO}_2$ +Urea 处理用以分析甲烷氧化和硝化之间的相互作用。其中, 添加尿素的处理均包括 N $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土 (U20)

和 $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土 (U100) 两个氮素水平。试验流程如图 1 所示, 每周用高纯空气 (20% O_2 , 80% N_2) 换气 1 min, 保证有氧环境, 同时以溶液的形式逐滴加入尿素溶液, 调节 60% 田间持水量, 血清瓶胶

表 1 微宇宙培养试验处理概况

Table 1 Schedule of the treatments

处理 Treatment	CH_4 (v/v)	尿素 Urea / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	CO_2 (v/v)
$^{13}\text{CH}_4$	1%	—	—
U20+ $^{13}\text{CO}_2$	—	20	5%
U100+ $^{13}\text{CO}_2$	—	100	5%
U20+ $^{13}\text{CH}_4$ + $^{13}\text{CO}_2$	1%	20	5%
U100+ $^{13}\text{CH}_4$ + $^{13}\text{CO}_2$	1%	100	5%
U20+ $^{12}\text{CH}_4$ + $^{12}\text{CO}_2$	1%	20	5%
U100+ $^{12}\text{CH}_4$ + $^{12}\text{CO}_2$	1%	100	5%

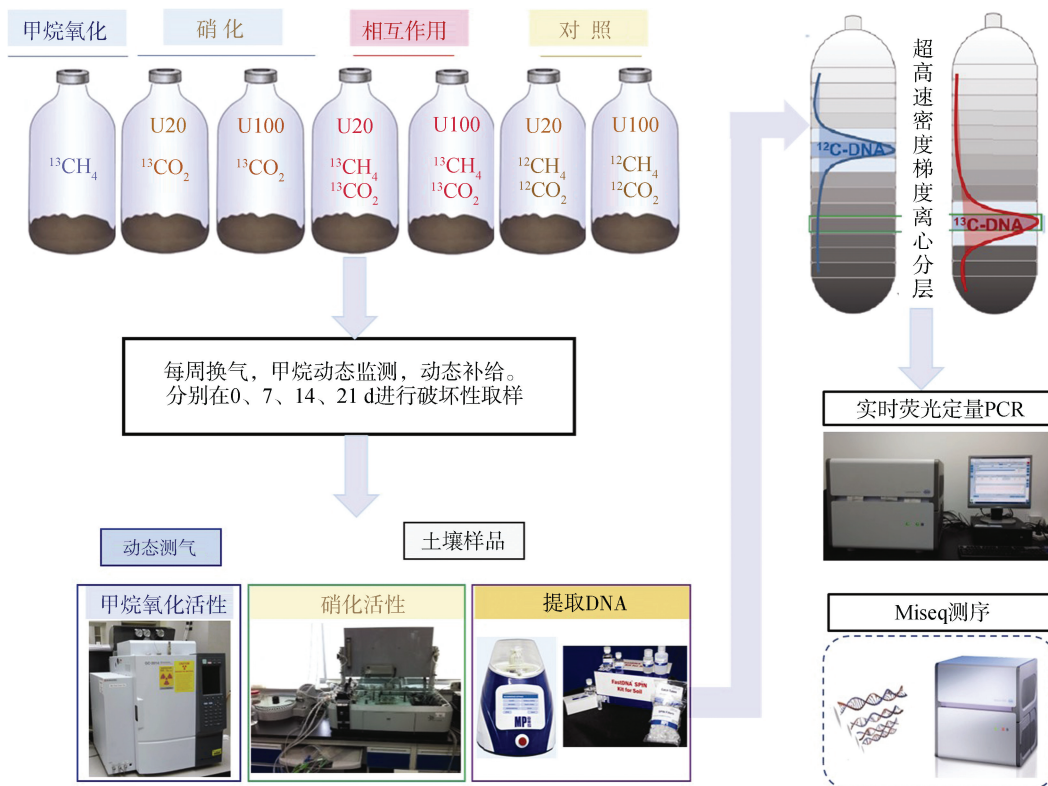


图 1 实验流程图

Fig. 1 The experimental procedure

塞加铝盖密封后加 5% 的 CO_2 。其中甲烷浓度动态监测, 随时添加, 保证 1% 浓度。在 25 °C 生化培养箱中黑暗培养 21 d, 分别在 0、7、14、21 d 进行破坏性取样。所取样品分两部分, 2 g 左右保存在 -80 °C 冰箱, 用以提取土壤 DNA; 剩余样品用以分析硝化活性。

1.3 DNA 提取和 SIP 分层

将 0 d 和 21 d 的土壤样品用 FastDNA Spin Kit for Soil (MP) 提取土壤基因组总 DNA。用 0.7% 的凝胶电泳检测 DNA 的完整性, NanoDrop® ND-2000 UV-Vis spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) 检测 DNA 的质量和纯度。DNA 样品 -20 °C 冰箱保存, 用以进行超高速等密度梯度离心。

SIP 分层方法参考文献[13]。具体操作方法如下: 大约 3 μg DNA 与 4.9 mL 氯化铯 (CsCl) 溶液混合, 调节浮力密度至 $1.725 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。然后将混合液转移至 5.1 mL 超高速离心试管中, 调平密封后用贝克曼 Vti65.2 转子 (Beckman Coulter Inc., Palo Alto, CA, USA) 在 20 °C 条件下以 $177\ 000\times\text{g}$ 的速度离心 44 h。离心结束后, 利用 NE-1000 注射器泵 (New

Era Pump Systems Inc., Farmingdale, NY, USA) 将新灭菌蒸馏水以稳定流速 ($0.38 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 从上向下将溶于 CsCl 中的 DNA 置换到 15 个 1.5 mL 离心管中, 即每个土壤 DNA 样品分层后总共得到 15 层 DNA 组分溶液, 每层体积为 380 μL , 取 65 μL 用手持式 AR200 折光率仪 (Reichert Inc., Buffalo, NY, USA) 测定折光率。将分层后的 DNA 组分溶液用 PEG6000 和乙醇纯化, 溶于 30 μL 新灭菌蒸馏水进行后续分析。

1.4 甲烷氧化菌 *pmoA* 和氨氧化菌 *amoA* 基因的定量 PCR

将 0 d 和 21 d 的总 DNA 以及上述分层纯化后的 DNA 样品进行 *pmoA* 和 *amoA* 基因的定量 PCR 分析 (LightCycler 480, Roche Applied Science), 具体引物信息和 PCR 条件见表 2。反应体系 20 μL , 包括 10 μL SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa, Dalian, China)、1.5 μL DNA 模板 (1~10 ng)、0.79 μL milli-Q 水, 体系中引物终浓度 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。最后跑溶解曲线, 利用 50~99 °C 的升温连续检测荧光以确认 PCR 产物的特异性。本实验定量 PCR 扩增效率在 80.5%~108.3% 之间, R^2 值在 0.990~0.998 之间。

表 2 本试验中引物信息及 PCR 条件

Table 2 Primers and conditions used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'~3') Primer sequence (5'~3')	目的基因 Target gene	扩增条件 Thermal conditions	参考文献 Reference	
AOA	Arch-amoAF	STA ATG GTC TGG CTT AGA CG	archaeal	95 °C 2 m; 40 cycles of 95 °C	[14]
	Arch-amoAR	GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT	<i>amoA</i> gene	20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s	
AOB	amoA-1F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	bacterial	95 °C 2 m; 40 cycles of 95 °C	[15]
	amoA-2R	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	<i>amoA</i> gene	20 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s	
MOB	A189F	GGNGACTGGGACTTCTGG	<i>pmoA</i> gene	94 °C 2 m; 40 cycles of 94 °C	[16]
	mb661r	CCGGMGCAACGTCYTTACC		20 s, 60 °C 45 s, 72 °C 30 s	
16S	515F	GTG CCA GCM GCC GCG G	universal	95 °C 3 m; 32 cycles of (95 °C	[17]
rRNA	907R	CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT	16S rRNA genes	30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s); 72 °C 10 m	

1.5 Miseq 测序、系统发育分析和共线性网络分析

将 0 d 和 21 d 的总 DNA 以及上述分层纯化后的重层 DNA 样品进行 Miseq 高通量测序。利用 Illumina®MiSeq 测序仪 (Illumina, San Diego, CA, USA) 对上述 DNA 的 16S rRNA 基因的 V4 区进行

测序, 引物序列及扩增条件见表 2。本实验中, 只有序列长度大于 200 bp, 平均质量大于 25, 没有模糊噪声, 至少 80% 符合 16S rRNA 序列的结果才会进行后续分析。在 97% 序列相似度水平上进行 OTU (可操作分类单元) 聚类, 最后参考 Silva 数据库对

OTU 进行物种注释^[18]。

总 DNA 样品共得到 1 149 320 条高质量序列，平均每个样品得到 47 888 个高质量序列。其中属于细菌的序列有 1 123 384 条，占 97.74%；属于古菌的序列有 25 936 条，占 2.26%。重层 DNA 样品在 $^{13}\text{CH}_4$ 、 $\text{U}20+^{13}\text{CO}_2$ 、 $\text{U}100+^{13}\text{CO}_2$ 、 $\text{U}20+^{13}\text{CH}_4+^{13}\text{CO}_2$ 和 $\text{U}100+^{13}\text{CH}_4+^{13}\text{CO}_2$ 处理下分别得到 426 842、407 179、429 748、501 376 和 480 393 条高质量序列。

选取属于 MOB、AOA、AOB 和 NOB 的序列，用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7.0) 分别进行系统发育分析。以重层 MOB、AOB 和 NOB 的 OTU 丰度表为原始数据，采用 Spearman 相关系数模型，显著性 $P < 0.05$ ，通过 CoNet 软件构建共线性网络图，Gephi 0.9.2 对网络图进行可视化分析。网络图包括节点和边，各节点代表不同的物种，以颜色区分。边代表物种之间的相互作用，红色和绿色分别代表正相关和负相关，线的粗细表示相关性的大小。将总 DNA 和重层 DNA 的测序数据上传至 NCBI 的 Sequence Read Archive (SRA) 数据库，检索号分别为 PRJNA611699 和 PRJNA611713。

1.6 数据处理

硝化活性、甲烷氧化活性、*pmoA/amoA* 基因丰度和相对丰度的显著性差异分析通过 SPSS 20.0 单因素方差分析 (one-way ANOVA) 的 Duncan 多重检验完成；作图通过 Origin 9.0 完成； $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结 果

2.1 甲烷氧化活性和甲基营养微生物

氮素水平对甲烷氧化活性和相关微生物丰度均有显著影响 (图 2)，经过 21d 的微宇宙培养，相比不施氮 (U0)，甲烷氧化活性、*pmoA* 基因丰度和甲基营养微生物相对丰度在低氮水平 (U20) 下显著增加，在高氮水平 (U100) 下显著降低。在 U0、U20 和 U100 三个处理下，甲烷氧化活性分别是 37.79 、 45.27 和 $16.11 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土，*pmoA* 基因丰度分别是 3.08×10^7 、 4.24×10^7 和 9.50×10^6 copies·g⁻¹ 干土。甲烷氧化活性、*pmoA* 基因丰度以及甲基营养微生物的相对丰度均在不同氮水平下呈现出“低促高抑”的规律 (图 2)。

2.2 硝化活性和硝化微生物

净硝化速率、硝化微生物丰度和相对丰度如图 3 所示。U20、U20+CH₄、U100 和 U100+CH₄ 的净硝化速率分别为 51.57 、 34.60 、 163.50 和 $165.02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土 (图 3a)；AOB *amoA* 基因丰度分别为 1.90×10^8 、 1.23×10^8 、 6.34×10^8 、 8.04×10^8 copies·g⁻¹ 干土 (图 3b)。低氮水平下，CH₄ 的存在显著抑制硝化活性和 AOB *amoA* 基因丰度；而高氮水平下，CH₄ 的存在对硝化活性和 AOB *amoA* 基因丰度没有显著影响。AOB 和 NOB 的相对丰度也符合该规律 (图 3d, 3f)。AOA *amoA* 基因的丰度和相对丰度在培养 21 d 之后显著

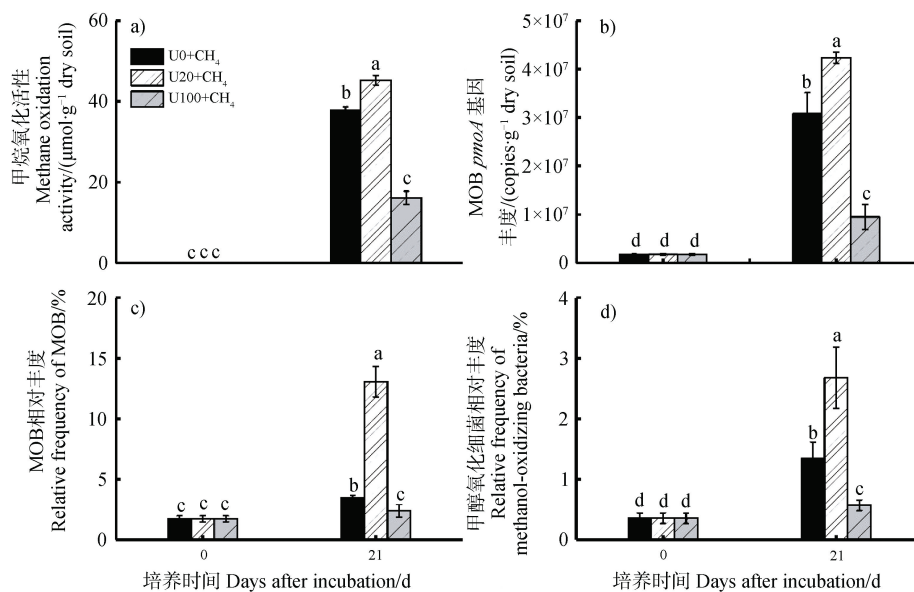


图 2 甲烷氧化活性 (a)、甲烷氧化细菌 *pmoA* 基因丰度 (b) 和甲基营养微生物相对丰度 (c~d) 分析

Fig. 2 Changes in methane oxidation activity (a) and quantitative distribution of methanotrophs (b-d) in soil microcosms over an incubation period of 21 days

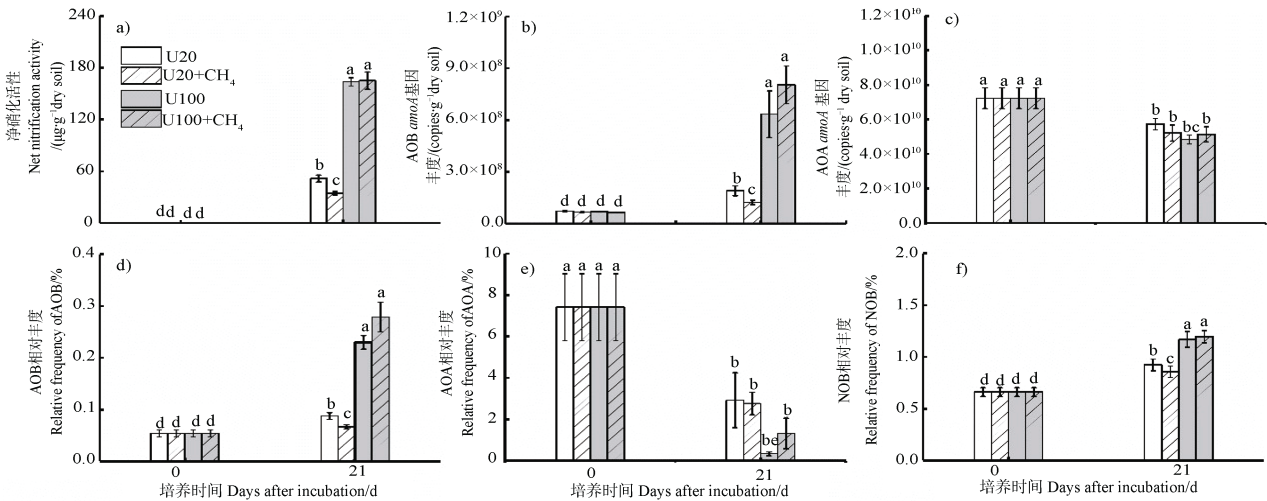


图3 净硝化活性 (a) 和氨氧化微生物 *amoA* 基因丰度 (b~c), 硝化微生物相对丰度 (d~f) 分析

Fig. 3 Net nitrification activity (a) and quantitative distribution of nitrifiers (b-f) in soil microcosms over an incubation period of 21 days

降低, 甲烷存在与否对 AOA *amoA* 基因丰度影响不显著 (图 3c, 图 3e)。

2.3 DNA-SIP 技术鉴定活性甲烷氧化和硝化微生物

离心后每个样品分为 15 层, 浮力密度在 $1.676 \sim 1.791 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间。对每一层进行 *pmoA* 和 *amoA* 基因的定量 PCR 分析, 然后将每一层的分析结果与各层次中最大的基因丰度作比, 得到 *pmoA* 和 *amoA* 基因在各浮力密度梯度中的分布图 (图 4a)。甲烷氧化菌在不施氮处理中被显著标记, 低氮处理增加了 MOB 被标记的程度, 而高氮处理则降低了 MOB 的标记程度。AOB 在低氮和高氮水平下均被显著标记, 尤其是在高氮水平下的标记更显著。低氮水平下, 甲烷的存在抑制 AOB 的被标记程度。低氮和高氮水平下, AOA 均没有被标记。根据定量分布结果选取重层 DNA (3~12 层) 进行高通量测序, 选择分别属于 MOB、AOB 和 NOB 的 OTU 绘制各浮力密度上的相对丰度分布图, 结果如图 4b、图 4c。MOB 和 AOA 的相对丰度在各浮力密度的分布趋势和上述定量分析的结果完全一致。AOB 和 NOB 的相对丰度分布图显示低氮水平和高氮水平下, 甲烷的存在对 AOB 和 NOB 的被标记程度均有抑制效果。

2.4 活性甲烷氧化微生物和硝化微生物的群落结构

如图 5 所示, 草原土壤 99.7% 以上的 MOB 属于甲基杆菌属 (*Methylobacter*); 活性 MOB 包括甲基杆菌属 (*Methylobacter*) 和甲基暖菌属 (*Methylocaldum*), 以 *Methylobacter* 为主, 占 90% 以上。活性 *Methylobacter* MOB 在 $\text{U}0+^{13}\text{CH}_4$ 、 $\text{U}20+^{13}\text{CH}_4$ 和 $\text{U}100+^{13}\text{CH}_4$ 的处

理中所占的比例分别为 92.62%、96.35% 和 91.79%, 活性 *Methylocaldum* MOB 所占的比例分别为 7.38%、3.65% 和 8.21%。硝化微生物 AOB 主要包括亚硝化球菌属 (*Nitrosococcus*)、亚硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*) 和亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*), 分别占 72.00%、26.00% 和 2.00%。65% 以上的活性 AOB 为 *Nitrospira*, 其在 U20、 $\text{U}20+^{13}\text{CH}_4$ 、U100、 $\text{U}100+^{13}\text{CH}_4$ 处理中对 AOB 的占比分别为 65.33%、80.23%、78.30% 和 82.10%; *Nitrosomonas* 在 AOB 中的占比分别为 28.41%、10.13%、20.77% 和 16.13%; *Nitrosococcus* 在 AOB 中的占比分别为 6.25%、9.64%、0.93% 和 1.77%。该草原土壤中的亚硝酸盐氧化细菌 (NOB) 均隶属于 *Nitrospira*, 包括 *defluvii*、*moscoviensis* 和 *marina* 三个种。活性 NOB 以 *defluvii* 为主, 其在 U20、 $\text{U}20+^{13}\text{CH}_4$ 、U100、 $\text{U}100+^{13}\text{CH}_4$ 处理的占比分别是: 71.3%、61.9%、78.4% 和 78.8%; *moscoviensis* 的占比分别为: 23.6%、27.7%、16.9% 和 14.5%; *marina* 的占比分别为 5.1%、10.4%、4.7% 和 6.7%。

2.5 活性甲烷氧化微生物和硝化微生物的共线性网络

为明确活性甲烷氧化微生物和硝化微生物的相互作用, 将重层 MOB、AOB 和 NOB 的高丰度 OTU 构建共线性网络图 (图 6)。结果发现, *Methylobacter* MOB 与 *Nitrospira* AOB 存在显著的负相关关系, 此外, *Methylobacter* MOB 还与 *Nitrospira* NOB 存在显著的负相关关系, *Nitrosococcus* AOB 与 *Nitrospira* NOB 存在显著正相关关系。

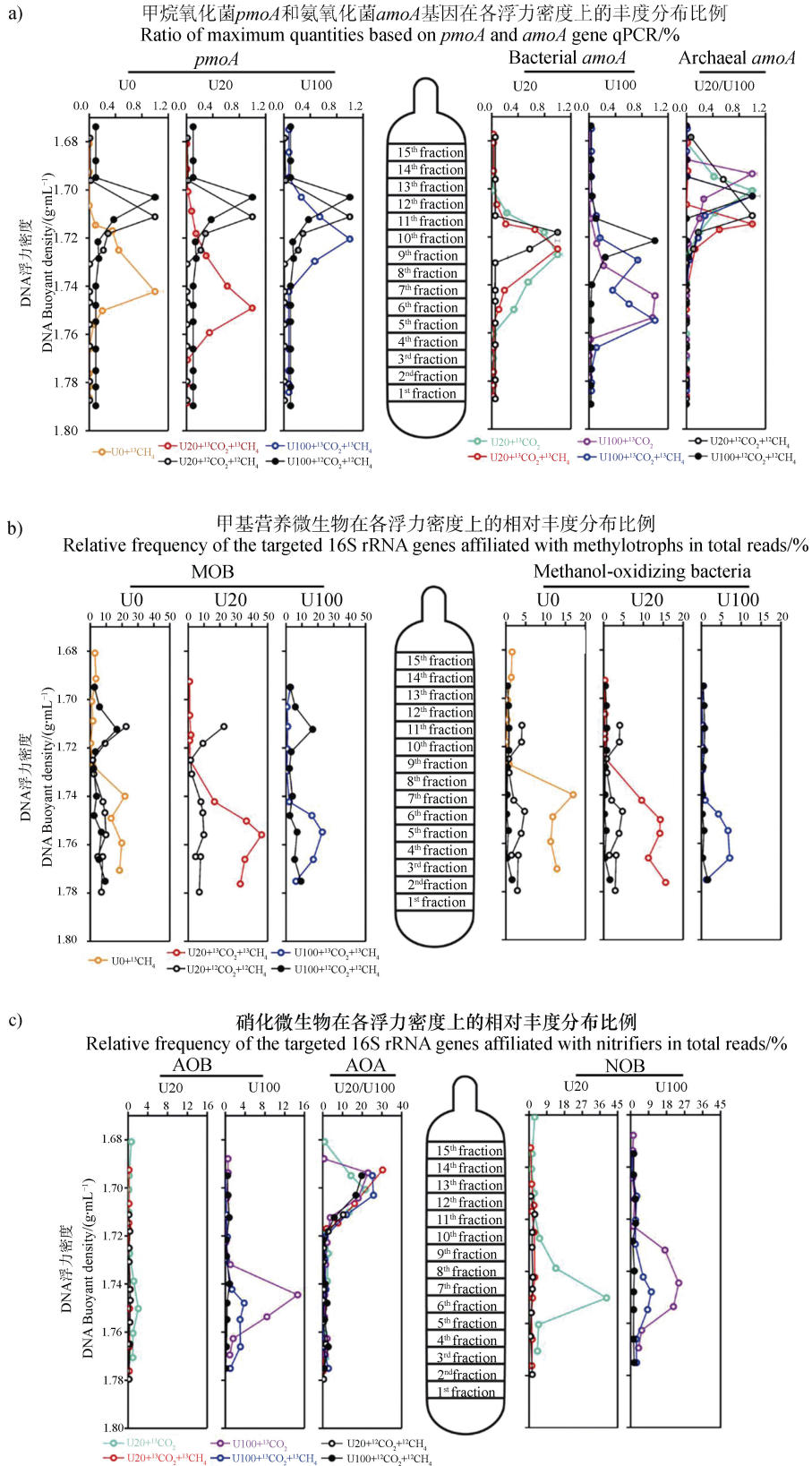


图 4 甲基营养微生物和硝化微生物丰度和相对丰度在不同浮力密度上的分布

Fig. 4 Quantitative distribution of methanotrophs as well as nitrifiers across the entire buoyant density gradient of the fractionated DNA from soil microcosms after incubation for 21 days

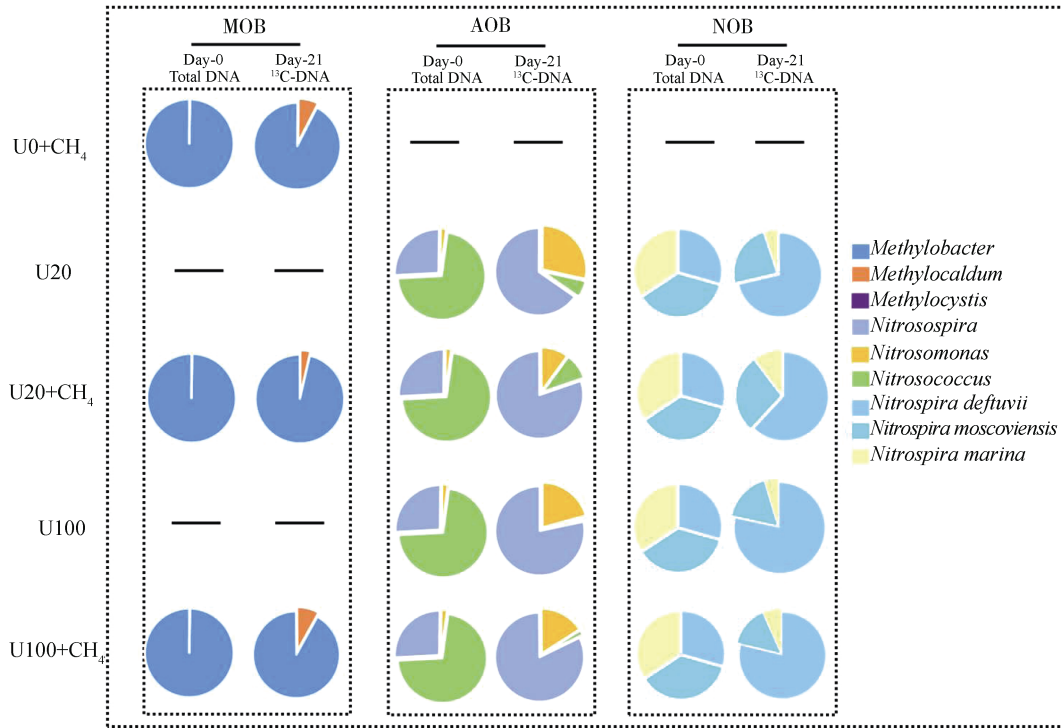
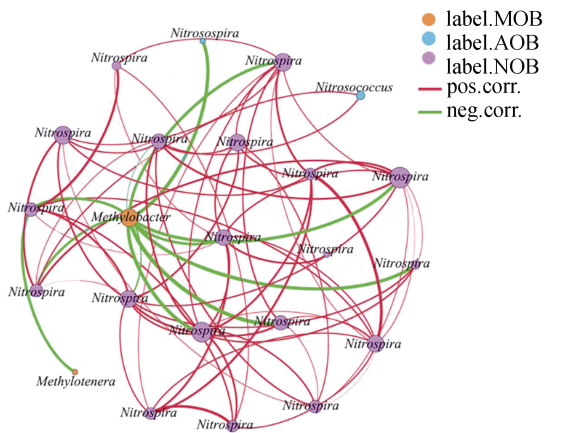


图 5 活性甲烷氧化微生物和硝化微生物的群落组成分析

Fig. 5 Proportional changes of active methanotrophs and nitrifying phylotypes in SIP microcosms after an incubation period of 21 days



注：红线表示正相关，绿线表示负相关；线的粗细表示相关性的强弱。橙色圆代表标记的 MOB (*Methylobacter* 和 *Methylothera*)；蓝色圆代表标记的 AOB (*Nitrosospira* 和 *Nitrosococcus*)；红色圆代表标记的 NOB (*Nitrospira*)。Note: Connecting lines stand for significant ($P < 0.05$) positive (red) or negative (green) correlations where thicker lines represent stronger correlations. Orange circles represent labeled MOB: *Methylobacter* and *Methylothera*; Blue circles represent labeled AOB: *Nitrosospira* and *Nitrosococcus*; Red circles represent labeled NOB: *Nitrospira*.

图 6 活性 MOB、AOB 和 NOB 的共线性网络图

Fig. 6 Network analysis of co-occurring phylotypes of active MOB, AOB and NOB in microcosms

3 讨论

3.1 氮素水平对甲烷氧化活性和活性甲烷氧化微生物的影响

甲烷氧化活性分析结果表明 (图 2a), U20 显著刺激甲烷氧化, 而 U100 显著抑制甲烷氧化。草原土壤中甲烷氧化能力对氮素的响应体现出“低促高抑”的趋势。对 0 d 和 21 d 总 DNA 的 *pmoA* 定量分析 (图 2b) 结果发现, 和甲烷氧化活性一致, 低氮处理的土壤 *pmoA* 丰度显著高于不施氮处理, 而高氮处理的 *pmoA* 丰度显著低于不施氮处理。这个结果进一步说明甲烷氧化活性对氮素的“低促高抑”响应。甲烷氧化菌和甲醇氧化菌的相对丰度变化也符合该趋势 (图 2c、图 2d)。SIP 分析结果同样发现 MOB 在不施氮处理中被明显标记, 在低氮处理中标记程度显著增加, 而在高氮处理中仅轻微标记 (图 4a)。不同浮力密度上的 MOB 相对丰度分布也符合以上特点 (图 4b)。这可能是由于该围封草原土壤 N 素主要来源是氮沉降和氮固定, 整体 N 素水平较低, 加入 $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土的尿素刺激土壤甲烷氧化菌, 导致其大量繁殖, 活性增加, 从而提高甲烷氧化能力。

100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土的尿素态 N 显著刺激了硝化微生物的繁殖, 抑制了甲烷氧化菌的繁殖和功能发挥, 同时, 氨氧化产生的中间产物羟胺 (NH_2OH) 和亚硝酸盐 (NO_2^-), 以及硝化终产物硝酸盐 (NO_3^-) 均会对甲烷氧化菌产生毒害作用, 进而抑制甲烷氧化活性。本实验用 $^{13}\text{CO}_2$ 标记活性硝化微生物, $^{13}\text{CH}_4$ 标记活性甲烷氧化微生物, 两者均不会以被标记的微生物体的有机碳作为碳源进行繁殖, 所以即便可能存在 cross-feeding 问题, 对本实验结果的影响会非常小。因此, 本实验中利用 DNA-SIP 技术分析确定活性甲烷氧化微生物和硝化微生物, 其结果是可靠的。

关于氮对甲烷氧化活性影响的争论由来已久。氮添加可能刺激甲烷氧化以及甲烷氧化细菌的活性, 因为甲烷氧化菌生长需要氮源^[4, 11-12]。但是也有研究发现氮添加会抑制甲烷氧化活性。这种抑制情况一方面是因为 NH_3 与 CH_4 竞争 MMO 活性位点导致抑制效应; 另一方面氨氧化中间产物 NH_2OH 和 NO_2^- 会对甲烷氧化菌产生毒害作用也会抑制甲烷氧化活性^[4]。

本世纪初, Stein 等^[4]提出铵盐对 MOB 刺激还是抑制取决于铵态氮与甲烷态碳的比例 ($\text{N}\text{-CH}_4$)。然而, Bodelier^[19]和 Zheng^[12]等发现 $\text{N}\text{-CH}_4$ 比分别为 200 和 0.11 时, 尿素添加均显著刺激甲烷氧化。而本实验中 U100 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土) 处理的 $\text{N}\text{-CH}_4$ 比仅为 0.70, 但是显著抑制了甲烷氧化。同样, Zhang 等^[20]通过四年田间试验也发现 $100 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}\cdot\text{a}^{-1}$ (约 $158 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土) 的氮添加显著抑制甲烷氧化。Zhao 等^[21]推测氮肥对甲烷氧化的刺激或抑制作用可能取决于主要甲烷氧化菌的种系型, 比如, Zheng 等^[12]发现水稻土中添加尿素后, 活性甲烷氧化微生物以 *Methylobacter* 为主, 而未施加尿素的处理以 *Methylosarcina* 为主。在本草原土的试验中, 无论是否添加尿素以及添加尿素多少, 均是以 *Methylobacter* 为主^[22]。因此, 有关氮素水平对甲烷氧化的机理尚不明确, 未来关于氮素对甲烷氧化影响的研究可考虑多种类型土壤的综合分析。

3.2 甲烷对净硝化活性和活性硝化微生物的影响

类似于对 MOB 的分析, 本实验对氨氧化功能微生物在 0 d 和 21 d 的总 DNA 分别进行定量分析。结果显示 (图 3b), 低浓度和高浓度氮添加均会刺激 AOB 丰度的增长, 而抑制 AOA 的繁殖, 说明

AOB 在硝化作用过程中具有重要作用。DNA-SIP 结果发现 AOB 在各处理中被 ^{13}C 标记, 而 AOA 在各种处理中均未表现出明显的被标记迹象 (图 4a), 说明 AOB 同化了来自 CO_2 的 ^{13}C , 进一步证明 AOB 是驱动该草原土壤硝化作用的活性硝化微生物。

不同浮力密度范围的 AOB *amoA* 分布, 以及 AOB 和 NOB 相对丰度的分布进一步表明低氮水平下, 甲烷添加显著抑制了活性硝化微生物同化 $^{13}\text{CO}_2$ (图 4a, 图 4c)。Zheng 等^[12]在水稻土的研究发现, $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土的尿素处理, 甲烷添加显著抑制硝化活性和活性硝化微生物。而本研究发现, 在草原土壤中, 添加 $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土的尿素, 甲烷即显著抑制活性硝化微生物同化 $^{13}\text{CO}_2$, 降低硝化活性, 而 $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土的尿素处理下, 硝化活性和活性硝化微生物对甲烷添加无响应。无机氮对于生物量的形成是至关重要的, 尤其是对于那些缺乏固定分子态 N 的甲烷氧化菌来说。说明甲烷对硝化活性的抑制作用可能只出现在氨氧化底物不足时, 氨氧化微生物和甲烷氧化微生物竞争 N 源^[4], 一部分 N 作为 N 源被甲烷氧化菌同化^[12], 但是当 N 源浓度较高时, 甲烷氧化微生物反被抑制 (图 2, 图 4), 丧失了与氨氧化微生物竞争的能力。结合上述氮水平对甲烷氧化的影响, 氮素添加体现出对甲烷氧化的刺激效应时, 甲烷的存在就会抑制氮素转化 (硝化作用); 氮素添加体现出对甲烷氧化的抑制效应时, 甲烷的存在对氮素转化过程 (硝化作用) 没有显著影响, 说明甲烷氧化和硝化过程的相互作用关系受氮素水平的调控。

3.3 活性甲烷氧化和硝化微生物及相互作用

群落组成分析发现, 活性 MOB 群落结构比较单一, 以 Type Ia 的甲基杆菌属 (*Methylobacter*) 为主, 占 90% 以上, 还有一些 Type Ib 的甲基暖菌属 (*Methylocaldum*) 和极少比例的 Type II 型的 *Methylocystis*。一方面, 研究发现 Type Ia 型甲烷氧化菌在湿地、水稻土、冰下水系等多种环境中均作为主要的甲烷氧化微生物^[23-24]; 另一方面, 通过菌株分离分析发现, 高浓度甲烷条件下的 *Methylobacter* 活性远高于低浓度甲烷环境^[23]。此外, 在本试验中, 尿素施入并没有改变草原土壤中活性甲烷氧化微生物的群落组成, 这一结果与 Zhao 等^[21]在水稻土中的发现一致, 说明草原土和水稻土中氮有效性不是决定甲烷氧化微生物组成的关键因子。本试验发现

活性硝化微生物以 *Nitrosospira* AOB 和 *Nitrospira* NOB 为主, 这一结果与之前在草原土壤^[7]、水稻土壤^[12]和森林土壤^[25]中的研究结果一致。

尿素对甲烷氧化菌群落的低促高抑主要反应在 *Methylobacter* MOB, *Methylobacter* 菌株生长需要氮源, 但其不具备固氮能力^[26], 因此, 氮施入可促进 *Methylobacter* 生长繁殖。但随着施氮量增加, 硝化活性增强, 硝化作用产生的 NH_2OH 和 NO_2^- 以及硝化产物 NO_3^- 对 MOB 均存在毒害作用; 活性 *Nitrosospira* AOB 和 *Nitrospira* NOB 比例随施氮量增加而增加, 导致 MOB 与 AOB/NOB 在同一生境中竞争 O_2 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和生存空间, 网络分析结果也发现 *Methylobacter* 与活性硝化微生物(*Nitrosospira* AOB 和 *Nitrospira* NOB) 存在显著负相关关系。结合低氮条件下, 甲烷氧化增强而硝化被抑制; 高氮水平下, 硝化增强而甲烷氧化被抑制, 说明草原土壤中甲烷氧化和硝化之间存在氮引发的 *Methylobacter* MOB 与 *Nitrosospira* AOB/*Nitrospira* NOB 之间的竞争性相互作用关系。

4 结 论

草原土壤甲烷氧化活性及微生物功能活性在低浓度氮素水平下显著增加, 而在高浓度氮素水平下显著降低, 呈现出“低促高抑”现象。N 对甲烷氧化的影响(刺激或抑制)可能是土壤条件和主要微生物种系型共同作用的结果。DNA-SIP 结果发现, 活性甲烷氧化微生物以 *Methylobacter* 为主, 活性硝化微生物以 *Nitrosospira* AOB 和 *Nitrospira* NOB 为主。而网络分析结果发现 *Methylobacter* MOB 和 *Nitrosospira* AOB/*Nitrospira* NOB 之间存在显著负相关关系, 说明甲烷氧化和硝化微生物之间存在竞争性相互作用。以上结果表明甲烷氧化和硝化过程的相互作用受氮素水平的调控。

参考文献 (References)

- [1] Stocker T F, Qin D, Plattner G K, et al. Climate Change 2013: The physical science basis. contribution of working group I to the fifth assessment report of IPCC the intergovernmental panel on climate change[EB/OL]. 2014.
- [2] Shcherbak I, Millar N, Robertson G P. Global metaanalysis of the nonlinear response of soil nitrous oxide (N_2O) emissions to fertilizer nitrogen[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111 (25): 9199—9204.
- [3] Kolb S. The quest for atmospheric methane oxidizers in forest soils[J]. Environmental Microbiology Reports, 2009, 1 (5): 336—346.
- [4] Stein L Y, Roy R, Dunfield P F. Aerobic methanotrophy and nitrification: Processes and connections[M]// Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons Inc, 2012.
- [5] Jia Z J, Cai Z C. Methane consumption in relation to ammonia oxidation in paddy soils[J]. Rural Eco-Environment, 2003, 19 (4): 40—44. [贾仲君, 蔡祖聪. 稻田甲烷氧化与铵氧化关系研究进展[J]. 农村生态环境, 2003, 19 (4): 40—44.]
- [6] Sala O E, Austin A T, Vivanco L. Temperate grassland and shrubland ecosystems[M]//Encyclopedia of Biodiversity. Amsterdam: Elsevier, 2001: 627—635.
- [7] Pan H, Xie K X, Zhang Q C, et al. Archaea and bacteria respectively dominate nitrification in lightly and heavily grazed soil in a grassland system[J]. Biology and Fertility of Soils, 2018, 54 (1): 41—54.
- [8] Mo Y L, Jin F, Zheng Y, et al. Succession of bacterial community and methanotrophy during lake shrinkage[J]. Journal of Soils and Sediments, 2020, 20 (3): 1545—1557.
- [9] Deng Y C, Che R X, Wang F, et al. Upland Soil Cluster Gamma dominates methanotrophic communities in upland grassland soils[J]. Science of the Total Environment, 2019, 670: 826—836.
- [10] Cai Y F, Jia Z J. Research progress of atmospheric methane oxidizers in soil[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54 (8): 841—853. [蔡元锋, 贾仲君. 土壤大气甲烷氧化菌研究进展[J]. 微生物学报, 2014, 54 (8): 841—853.]
- [11] Daebeler A, Bodelier P L, Yan Z, et al. Interactions between Thaumarchaea, *Nitrospira* and methanotrophs modulate autotrophic nitrification in volcanic grassland soil[J]. The ISME Journal, 2014, 8 (12): 2397—2410.
- [12] Zheng Y, Huang R, Wang B Z, et al. Competitive interactions between methane-and ammonia-oxidizing bacteria modulate carbon and nitrogen cycling in paddy soil[J]. Biogeosciences, 2014, 11 (12): 3353—3368.
- [13] Jia Z J, Conrad R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11 (7): 1658—1671.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Kolb S, Knief C, Stubner S, et al. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA-targeted real-time PCR assays[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (5): 2423—2429.
- [17] Stubner S. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen™ detection[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 50 (2): 155—164.
- [18] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41 (D1): D590—D596.
- [19] Bodelier P L E, Hahn A P, Arth I R, et al. Effects of ammonium-based fertilisation on microbial processes involved in methane emission from soils planted with rice[J]. *Biogeochemistry*, 2000, 51 (3): 225—257.
- [20] Zhang L H, Yuan F H, Bai J H, et al. Phosphorus alleviation of nitrogen-suppressed methane sink in global grasslands[J]. *Ecology Letters*, 2020, 23 (5): 821—830.
- [21] Zhao J, Cai Y F, Jia Z J. The pH-based ecological coherence of active canonical methanotrophs in paddy soils[J]. *Biogeosciences*, 2020, 17 (6): 1451—1462.
- [22] Li Y, Liu Y W, Pan H, et al. Impact of grazing on shaping abundance and composition of active methanotrophs and methane oxidation activity in a grassland soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2020, 56 (6): 799—810.
- [23] Hao Q Q, Liu F H, Zhang Y C, et al. *Methylobacter* accounts for strong aerobic methane oxidation in the Yellow River Delta with characteristics of a methane sink during the dry season[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 704: 135383.
- [24] Sultana N, Zhao J, Zheng Y, et al. Stable isotope probing of active methane oxidizers in rice field soils from cold regions[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2019, 55 (3): 243—250.
- [25] Huang X R, Zhao J, Su J, et al. Neutrophilic bacteria are responsible for autotrophic ammonia oxidation in an acidic forest soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2018, 119: 83—89.
- [26] Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, et al. *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria*[M]. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015.

(责任编辑: 卢 萍)