土 壤 学 报
Acta Pedologica Sinica

DOI：10.11766/trxb202101220668
熊旭梅，周雪，郭佳，贾仲君，蒋先军. 不同 pH 和氧气条件下土壤古菌与海洋古菌的竞争适应机制[J]. 土壤学报，2021,
XIONG Xumei, ZHOU Xue, GUO Jia, JIA Zhongjun, JIANG Xianjun. Competitive Adaptation Mechanism of Soil Archaea and Marine Archaea under Different pH and Oxygen Conditions[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021,

不同 pH 和氧气条件下土壤古菌与海洋古菌的竞争适应机制*

熊旭梅 [1]，周 雪 [2,3]，郭 佳 [1]，贾仲君 [3†]，蒋先军 [1†]

（1. 西南大学资源环境学院，重庆 400715；2. 河海大学农业科学与工程学院，南京 210098；3.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）

摘 要：pH 和氧气是古菌氨氧化活性的关键限制因子。然而，复杂土壤中不同古菌生态型（土壤古菌和海洋古菌）对 pH 和氧气的竞争适应规律尚未有相关报道。选择活性氨氧化古菌（ammonia-oxidizing archaea, AOA）为类海洋古菌 Group1.1a-associated 的酸性森林土（pH5.40）和活性氨氧化古菌为土壤类古菌 Group 1.1b 的碱性水稻土（pH8.02），调节混合土壤 pH 和氧气浓度；设置稳定性同位素核酸探针实验，通过微宇宙室内培养，监测土壤硝化强度；利用实时荧光定量 qPCR 和 454 高通量测序研究 pH 和氧气对土壤氨氧化古菌和细菌的影响规律。结果表明：pH3.8 下没有硝化作用发生，而 pH6.0 和 7.6 则发生了强烈硝化作用，且高氧环境下硝化作用强于低氧环境；加底物培养后，氨氧化古菌数量明显增加；活性氨氧化古菌几乎全为土壤类古菌 Group 1.1b。研究表明：尽管氧气对硝化作用也有一定影响，但 pH 是影响硝化作用的主要因素；与类海洋古菌相比，土壤类古菌 Group 1.1b 更能适应高氧和低氧的碱性土壤环境，因此具有更强的竞争力。

关键词：pH；氧气；硝化作用；氨氧化微生物
中图分类号：S154　　　　**文献标志码**：A

Competitive Adaptation Mechanism of Soil Archaea and Marine Archaea under Different pH and Oxygen Conditions

XIONG Xumei[1], ZHOU Xue [2,3], GUO Jia[1], JIA Zhongjun[3†], JIANG Xianjun[1†]
(1. *College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing* 400715, *China*; 2. *College of Agricultural Science and Engineering, Hohai University, Nanjing* 210098, *China*; 3. *State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Nanjing Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing* 210008, *China*)

Abstract:【Objective】pH and oxygen were the key limiting factors for the ammonia oxidation activity of archaea.

* 国家自然科学基金重点项目（41530857）资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41530857)
† 通讯作者 Corresponding author，E-mail：jia@issas.ac.cn；jiangxj@swu.edu.cn
作者简介：熊旭梅（1998—），女，云南镇雄人，硕士研究生，主要从事土壤生物与物质循环有关研究。E-mail：xiongxumeiaa@163.com
收稿日期：2021-01-22；收到修改稿日期：2021-05-14；网络首发日期（www.cnki.net）：

The law of competition and adaptation of different archaea ecotypes (soil archaea and marine archaea) to pH and oxygen in complex soils are still unclear.【Method】Ammonia-oxidizing archaea (AOA) was selected as the marine archaea Group1.1a-associated with acid forest soil with pH = 5.40, and the active ammonia-oxidizing archaea were selected as the soil archaea Group 1.1b-associated with alkaline paddy soil with pH = 8.02. After adjusting the pH and oxygen concentration of the mixed soil, a stable isotopic probe microcosm indoor culture experiment was set up to analyze the intensity of soil nitrification. Also, quantitative PCR and 454 high-throughput sequencings were employed to study the effect of different pH and oxygen conditions on the number of soil ammonia-oxidizing archaea and bacteria and also the types of active ammonia-oxidizing microorganisms present.【Result】Compared with zero time, the contents of nitrate nitrogen and ammonium nitrogen had no change at pH3.8; At pH6.0 and 7.6, nitrate nitrogen content increased by 23 times and 19 times, respectively, and the ammonium nitrogen content decreased significantly. The results show that after the soil samples were mixed, there was no nitrification at pH 3.8, while strong nitrification occurred at pH 6.0 and 7.6. Also, the nitrification in a high-oxygen environment was stronger than that in a low-oxygen environment. After substrate culture, the number of oxidizing archaea was increased significantly; DNA-SIP shows that the active ammonia oxidizing archaea with pH 6.0 and 7.6 were almost all soil archaea Group 1.1b.【Conclusion】 This study reveals that pH rather than oxygen is the main factor affecting nitrification. Although oxygen also has a certain effect on nitrification; in neutral and alkaline soil, soil archaea lineage has greater activity in high O_2 and low O_2 environment and have more adaptive capacity than marine lineage.
Key words：pH; Oxygen; Nitrification; Ammonia oxidizers

微生物可能是地球上多样性和数量最大的生物类群，其代谢类型多样，强度高，代谢复杂，氨氧化微生物是已知少有的无机化能自养微生物，长期的地球进化选择使氨氧化微生物产生生态位分异，它们的代谢途径各不相同，氨氧化细菌（ammonia-oxidizing bacteria, AOB）通过氨单加氧酶（ammonia mono oxygenase, AMO）的作用下将氨氧化为羟胺，然后在羟胺氧化还原酶（Hydroxylamine oxidoreductase, HAO）的作用下氧化为 NO_2^-[1]。而氨氧化古菌（ammonia-oxidizing archea, AOA）可能通过未知的酶类将羟胺氧化为 NO_2^-。此外 AOA 的 AMO 以铜作为催化中心，缺乏细胞色素 C 蛋白与 AOB 在代谢途径上产生较大的差异[2]。代谢途径的不同以及自然条件下各环境因子的影响使得不同类群的氨氧化微生物广泛存在于农田、耕地、森林土壤、淡水环境以及污水处理厂[3]等生境中。环境因素包括底物和产物浓度、pH、温度、氧气浓度和水分状况均可能对氨氧化微生物产生影响，而 pH 是影响土壤性质以及氨氧化微生物群落结构的主要因素之一[4-5]。通过对 *amoA* 基因的系统发育分析，AOA 和 AOB 在发育水平上距离很远[6]，AOA 主导酸性土壤环境中的氨氧化作用[7-8]，而中性和碱性土壤中，主要由 AOB 起主导作用[9-10]，而在某些中性土壤中也可以有 AOA 主导，这说明 AOA 可能适应更广泛的 pH 环境。氧气是氨氧化反应的基质，其浓度的高低会对氨氧化微生物的生态位分异造成影响，而这种影响的根本原因是两种氨氧化微生物对氧气亲和力的差异。动力学研究发现，AOA 对氧气的半饱和常数较 AOB 的低[11-12]，使得 AOA 对氧气有更高的亲和力，在低氧环境中较 AOB 更有竞争优势。微宇宙实验中，当氧气浓度由 75%降低至 5%时，AOA 的 *aomA* 基因转录活性逐渐提高，而 AOB 的 *amoA* 基因转录活性减少了一个数量级[13]。在土壤生态系统中，研究者发现 AOA 的数量与土壤中氧气浓度呈反比，而 AOB 的数量与土壤氧气浓度正相关[14]。这些研究表明 AOA 对低氧环境的适应性更强。相较于 AOB, AOA 对环境更强的适应性可能是由于 AOA 具有更高的种群多样和代谢多样性。

氨氧化古菌主要包括海洋类古菌（Group 1.1a 和 Group 1.1a-associated）、土壤类古菌（Group1.1b）以及嗜热泉古菌（ThAOA）。其中海洋类古菌和土壤类古菌是氨氧化古菌的重要分支，研究其间的竞争关系及其对环境的适应对研究氨氧化古菌有重要意义。pH 和氧

气对氨氧化古菌的活性、相对丰度和群落结构产生影响，并可能对海洋类古菌（Group 1.1a 和 Group 1.1a-associated）和土壤类古菌（Group1.1b）生态位产生影响。有研究显示，海洋类古菌主导酸性环境氨氧化，而土壤类古菌则主要分布在中性和碱性土壤中[15]。Zhang 等[8]研究发现土壤类古菌与海洋类古菌在酸性土壤中表现出了较强的氨氧化活性。这一研究表明，氨氧化古菌对土壤环境变异的适应能力较强，其地理分异规律与高等生物并不完全一致。土壤环境与海洋环境氧气浓度差异大，土壤中由于土壤空隙和植物根系等原因，氧气浓度远高于海洋环境。因此，氧气条件可能会是土壤类氨氧化古菌与海洋类生态位分异的一个重要因素。

目前对土壤类 AOA 与海洋类 AOA 生态位研究并不多，且土壤类 AOA 主要在中性和碱性土壤中起作用，类海洋 AOA 在酸性环境中起作用。而在某些情况下土壤类古菌和类海洋古菌在酸性土壤中均有较强的氨氧化活性。两种古菌同时存在的情况下起主导的生态型氨氧化古菌尚不明确。pH 和氧气是影响微生物分布的重要环境因子。因此研究不同 pH 和氧气条件下土壤类 AOA 与海洋类 AOA 之间的竞争关系以及土壤类 AOA 与海洋类 AOA 对 pH 和氧气的适应机制，对明确其各自生态位有重要意义。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

供试土壤为酸性森林土和碱性水稻土。酸性森林土壤样品采自浙江省杭州市（30°14′N，120°09′E）。该区属于亚热带湿润性季风性气候，年均气温 17.0 ℃，年均降水量 1 533 mm，约 74%的降雨发生在 3 月至 9 月，土壤类型为红壤。碱性水稻土采自四川省资阳市（30°05′N，104°34′E）。该区属于亚热带季风性气候，年均气温 16.8 ℃；年均降水量 965 mm，土壤类型为紫色土。采样点已种植水稻超过百年，每年水稻生长季节施氮 250～350 $kg·hm^{-2}$。

2010 年 8 月采集土壤样品。各样地随机选取 3 个采样点，采集土壤表层 0～15 cm 新鲜土壤。去除杂物、植物根系等，充分混合均匀，室内自然风干，研磨过 2 mm 筛备用。酸性森林土 pH5.40，有机质 25.2 $g·kg^{-1}$，全氮 1.13 $g·kg^{-1}$，土壤活性氨氧化古菌为海洋类古菌 Group 1.1a-associated，氧气含量 17%～18%。碱性水稻土于水稻收割后采样，土壤 pH8.02，有机质 23.2 $g·kg^{-1}$，全氮 1.93 $g·kg^{-1}$，土壤活性氨氧化古菌为土壤类古菌 Group 1.1b，氧气含量 17%～18%。

1.2 样品分析

将 2 种过 2 mm 筛的土壤风干样品等干重混匀，按土水比 1∶2.5 测定混合土壤 pH，利用磷酸缓冲液将样品土壤调节为 6.0、7.6；利用磷酸缓冲液和 50%盐酸调节土壤 pH 至 3.8。静置一周后，验证土壤 pH。倒掉上清液，将样品与室内自然风干。采用重铬酸盐氧化法测定土壤有机质(SOM)含量。用流动分析仪测定无机氮含量。然后采用 FastDNA® Spin Kit for Soil（MP Biomedicals 公司）试剂盒提取土壤基因组总 DNA，且土壤微生物 DNA 浓度测定采用 NanoDrop®ND-1000 UV-Vis 分光光度计。

1.3 DNA-SIP 培养

进行土壤 DNA-SIP 微宇宙培养以研究活跃的土壤-硝化作用群落前先做预培养实验。将样品于培养箱 28 ℃预培养两周以降低本体土壤 CO_2 排放量，两周后将瓶内累计的 CO_2 排出，瓶内的 CO_2 浓度每周排放量(7 d 累积量)低于 0.5 %。$^{13}CO_2$+C_2H_2 对照处理加入 1.2 mLC_2H_2 进行 5 d 的预培养，失活土壤原位 AOA 和 AOB。

DNA-SIP 微宇宙培养包括 $^{13}CO_2$ 标记、$^{12}CO_2$ 标记和 $^{13}CO_2$+C_2H_2 对照处理三种处理。$^{13}CO_2$ 标记、$^{12}CO_2$ 标记和对照处理之间的成对比较用于评估氨氧化微生物是否同化 $^{13}CO_2$ 用

于自养生长。$^{13}CO_2$处理采用 Dropwise 的方式在每个培养瓶内将 178 μL 的 0.1 mol·L^{-1}的 ^{13}C-Urea 溶液，使得土壤中尿素 N 浓度达到 100 μg,密封培养瓶，随后注入 6.0 mL 的 $^{13}CO_2$；$^{12}CO_2$处理同样采用 Dropwise 的方式在每个培养瓶内将 178 μL 的 0.1 mol·L^{-1}的 ^{12}C-Urea 溶液，使得土壤中尿素 N 浓度达到 100 μg，密封培养瓶，随后注入 6.0 mL 的 $^{12}CO_2$；$^{13}C+C_2H_2$对照处理则是在 $^{13}CO_2$处理基础上加 1.2 mLC_2H_2。0.6%-O_2、21%-O_2处理是每周用压缩空气冲刷后，在 $^{13}CO_2$标记、$^{12}CO_2$标记和 $^{13}CO_2+C_2H_2$处理中加入对应的尿素溶液，密封培养瓶，用真空泵将培养瓶抽为真空，加入高纯度 N2,待内外气压平衡后，加入对应 CO_2气体和 C_2H_2气体，低氧处理每个培养瓶中加入 0.72 mLO_2，高氧处理每个培养瓶中加入 25.2 mLO_2。对于每次处理，将 5.0 g 风干土样的样品放入 120 mL 密封有丁基橡胶塞的血清瓶中，微生物在 28 ℃在黑暗中以 60％的土壤最大持水量培养。在为期 56 d 的培养期内每周用加压合成空气（80%氮气、20%氧气）冲洗每个瓶子的顶部空间 1 min 以维持有氧条件。培养期间不添加氮素。

1.4 超高速密度梯度离心以及 DNA 分离纯化

用NanoDrop测定样品的DNA含量，用10 mL注射器将5.1 mL的超高速离心混合液转移至6 mL的离心管中，并在20 ℃下用Beckman垂直离心转子Vti65.2（Beckman Coulter, Inc., Palo Alto, CA,USA）离心44 h，速度为45 000 r·min^{-1} 。超高速离心结束后，开始对DNA进行分层回收，在离心管上部以恒定的流速注入置换液（灭菌水），下部用灭菌离心管收集15个等体积不同密度的分层样品，参数设置：NE-1000固定流速泵（New Era Pump System, Inc., Farmingdale, NY, USA）流速0.38 mL·min^{-1} ；通过使用AR200手持式折光仪（Reichert Inc., Buffalo, NY, USA）测定15层液体每层的折光率来推导各层液体的浮力密度。向每层的离心管中加入550 μL的PEG6000溶液，头尾倒置若干次混匀溶液，室温静置2 h或者37 ℃加热1 h沉淀DNA，然后在15～20 ℃下130 00×*g*高速离心30 min，除去上清液；确保DNA沉淀中无液体存在后，将其溶于30 μL TE缓冲液，-20 ℃保存。

1.5 定量 PCR

AOB 和 AOA 中 *amoA* 基因的实时荧光定量 PCR-采用引物 *amoA*-1F (5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3')和 *amoA*-2R (5'-CCCCTCGGGAAAGCCTTCTTC-3')直接扩增总 DNA 中氨氧化细菌(AOB)*amoA* 的基因片段。采用引物 Arch-*amoA*F (5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3')和 Arch-*amoA*R (5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3') 直接扩增总 DNA 中氨氧化古菌(AOA) *amoA* 基因片段。PCR 扩增反应体系为 20 μL，包括 10 μL 的 SYBR Premix EX Taq TM（宝生物工程（大连）有限公司），上、下游引物（10 pmol·μL^{-1}）各 0.5 μL，1.0 μL 模板，8 μL 灭菌双蒸水。实时 PCR 条件如下：95 ℃ 预变性 3 min；95 ℃变性 30 s；55 ℃退火 30 s；72 ℃延伸 45 s ，32 个循环。

1.6 克隆测序

构建了 ^{13}C 标记的重层中古菌 *amoA* 基因的克隆文库，以推断本研究中活性 AOA 与保存在 GenBank 中的活性 AOA 的系统发育关系。Cren*amoA* 23f（5'-ATGGTCTGGCTWAGACG-3'）和 Cren*amoA* 616r（5'-GCCATCCATCTGTATGTCCA-3'）引物对从 ^{13}C 标记的 DNA 中获得的 *thaumarchaeal amoA* 基因进行扩增。通过引物 M13F/R 载体引物进行 PCR 验阳，利用凝胶电泳的方法跳出阳性菌液。挑出的阳性重组子选送进行下一步的测序（Invitrogen, 上海）。测序获得的序列首先用序列分析软件 DNAStar 进行序列质量控制，删去载体序列，获得目标基因序列。本研究采用在 NCBI 的 BLAST 功能，获得与所研究的微生物发育水平相近的序列，并与已获得纯菌株的代表性序列进行 DNA 比对，使用 MEGA 4.0 软件采用 Neighbour-joining algorithm 的方法构建系统发育树。

1.7 数据处理

进行线性回归分析、单因子方差分析多次比较测试。所有的分析使用 Microsoft Office

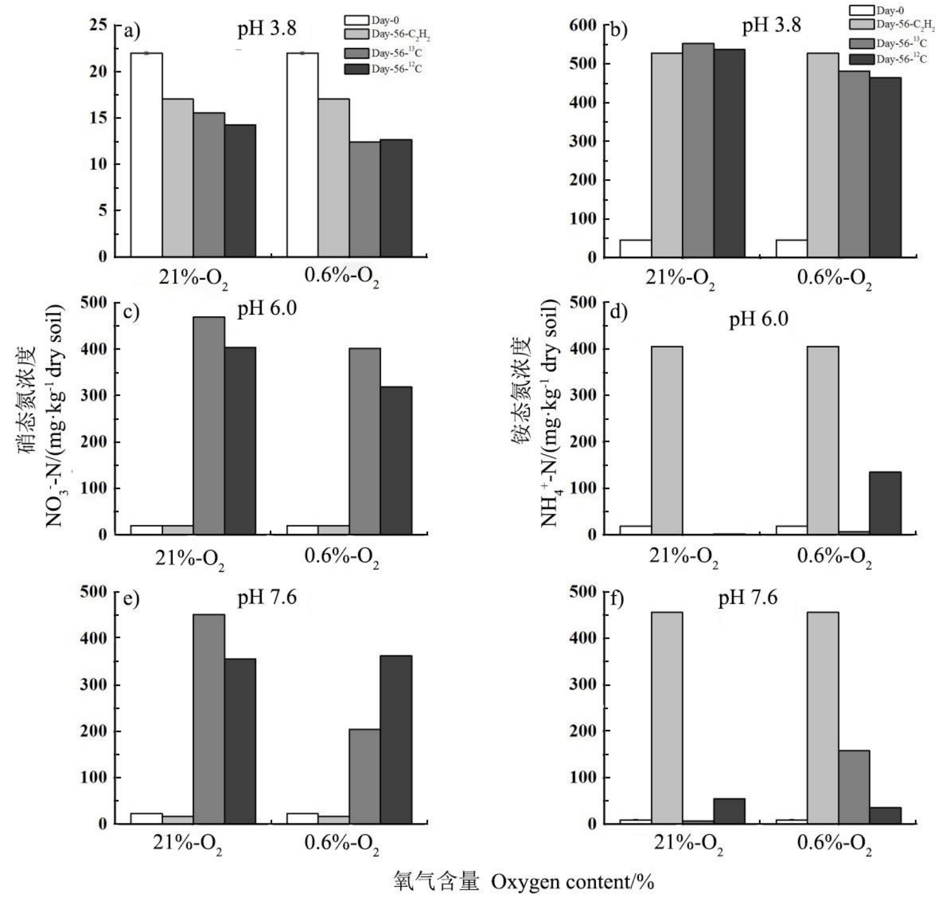
2007、Origin 8.1、Mothure、Mega4.0、Biotechnology Information(NCBI)-Blast 等进行，且 $P<0.05$ 在统计学上显著。

2 结 果

2.1 pH 和氧气浓度对硝化作用的影响

如图 1（a,c,e）所示，在添加尿素底物条件培养 56 d 下，高氧环境下，pH3.8 样品中，$^{13}CO_2+C_2H_2$、$^{13}CO_2$、$^{12}CO_2$ 3 个处理硝态氮含量分别为 17.60、15.55、14.28 mg·kg^{-1} 干土，与零时刻的 22.00 mg·kg^{-1} 干土相比无明显变化，表明几乎没有硝化作用发生。pH6.0 样品中，3 个处理硝态氮含量分别为 20.25、469.69、404. 53 mg·kg^{-1} 干土，与零时刻 22.29 mg·kg^{-1} 干土相比，$^{13}CO_2$ 处理硝态氮含量长了 23 倍，表现出强烈的硝化活性。pH7.6 处理中， 3 个处理硝态氮含量分别为 16.80、452.50、356.63 mg·kg^{-1} 干土，与零时刻 23.57 mg·kg^{-1} 干土相比，$^{13}CO_2$ 处理硝态氮含量长了 19 倍，表现出强烈的硝化活性。低氧环境下，pH3.8 处理样品中，$^{13}CO_2$、$^{12}CO_2$ 2 个处理硝态氮含量分别为 12.41、12.69 mg·kg^{-1} 干土，与零时刻相比无明显变化，表明几乎没有硝化作用发生。pH6.0 样品中，2 个处理硝态氮含量分别为 402.51、319.47 mg·kg^{-1} 干土，与零时刻干土相比，均表现出强烈的硝化活性，且高氧处理硝化通量高于低氧处理，但并不显著。pH7.6 样品处理中，2 个处理的硝态氮含量分别为 204.54、363.04 mg·kg^{-1} 干土，与零时刻 23.57 mg·kg^{-1} 干土相比，均表现出强烈的硝化活性，且高氧处理硝化通量较低氧处理高，约为其 2 倍。上述处理中，$^{13}CO_2+C_2H_2$ 处理与零时刻相比，都无明显变化，说明抑制效果明显。

如图 1（b,d,f）所示，每周添加 100 μg·g^{-1} 干土， 尿素培养 56 d 后，高氧环境下，pH3.8 处理样品中，初始铵态氮含量为 45.76 mg·kg^{-1} 干土，$^{13}CO_2$ 和 $^{12}CO_2$ 处理中，铵态氮浓度分别为 553.58、537.68 mg·kg^{-1} 干土，与 $^{13}CO_2+C_2H_2$ 处理的 528.45 mg·kg^{-1} 干土相比，无明显下降趋势，说明培养过程中，加入的铵态氮没有因转化为硝态氮而减少，没有发生硝化作用。pH6.0 处理样品中，初始铵态氮浓度为 19.01 mg·kg^{-1} 干土，2 个处理中，铵态氮浓度分别为 0.44、2.35 mg·kg^{-1} 干土，与 $^{13}CO_2+C_2H_2$ 处理的 405.98 mg·kg^{-1} 干土相比，有明显下降趋势，说明在 56 d 培养过程中，发生了强烈硝化作用，加入的铵态氮因转化为硝态氮而减少。pH7.6 处理样品中，初始铵态氮浓度为 9.57 mg·kg^{-1} 干土培养 8 周后，2 个处理中，铵态氮浓度分别为 7.40、55.50 mg·kg^{-1} 干土，与 $^{13}CO_2+C_2H_2$ 处理的 456.29 mg·kg^{-1} 干土相比，明显降低，硝化作用较强烈。低氧环境下，pH3.8 样品中，$^{13}CO_2$、$^{12}CO_2$ 2 个处理铵态氮含量分别为 482.31、464.92 mg·kg^{-1} 干土，与 $^{13}CO_2+C_2H_2$ 的 528.45 mg·kg^{-1} 干土相比无明显变化，表明几乎没有硝化作用发生。pH6.0 样品中，2 个处理铵态氮含量分别为 7.08、135.89 mg·kg^{-1} 干土，与 $^{13}CO_2+C_2H_2$ 的 405.98 mg·kg^{-1} 干土有明显下降趋势，说明在 56 d 培养过程中，发生了强烈硝化作用，加入的铵态氮因转化为硝态氮而减少。高氧和低氧处理相差不明显。pH7.6 样品中，2 个处理铵态氮含量分别为 158.19、36.08 mg·kg^{-1} 干土，与 $^{13}CO_2+C_2H_2$ 的 456.20 mg·kg^{-1} 干土相比明显降低，说明在 56 d 培养过程中，发生的硝化作用较强烈。且高氧处理铵态氮含量明显低于低氧处理。



注: Day-0 表示零时刻土壤; Day-56 表示加入 Urea 微宇宙培养 56 d；$^{13}C+C_2H_2$ 表示在培养中加入 $^{13}CO_2$ 标记底物的同时加上硝化抑制剂 CH_2；图表中的误差线表示三个真重复的计算值。Note: Day-0 means zero time soil. Day-56 means adding Urea Microcosm to culture for 56 days; $^{13}C+C_2H_2$ means adding $^{13}CO_2$ labeled substrate while adding nitrification inhibitor C_2H_2. The error bar in the chart means three True repeated calculations.

图 1 不同处理下土壤 NO_3^--N（a, c, e）、NH 4^+-N（b, d, f）含量变化

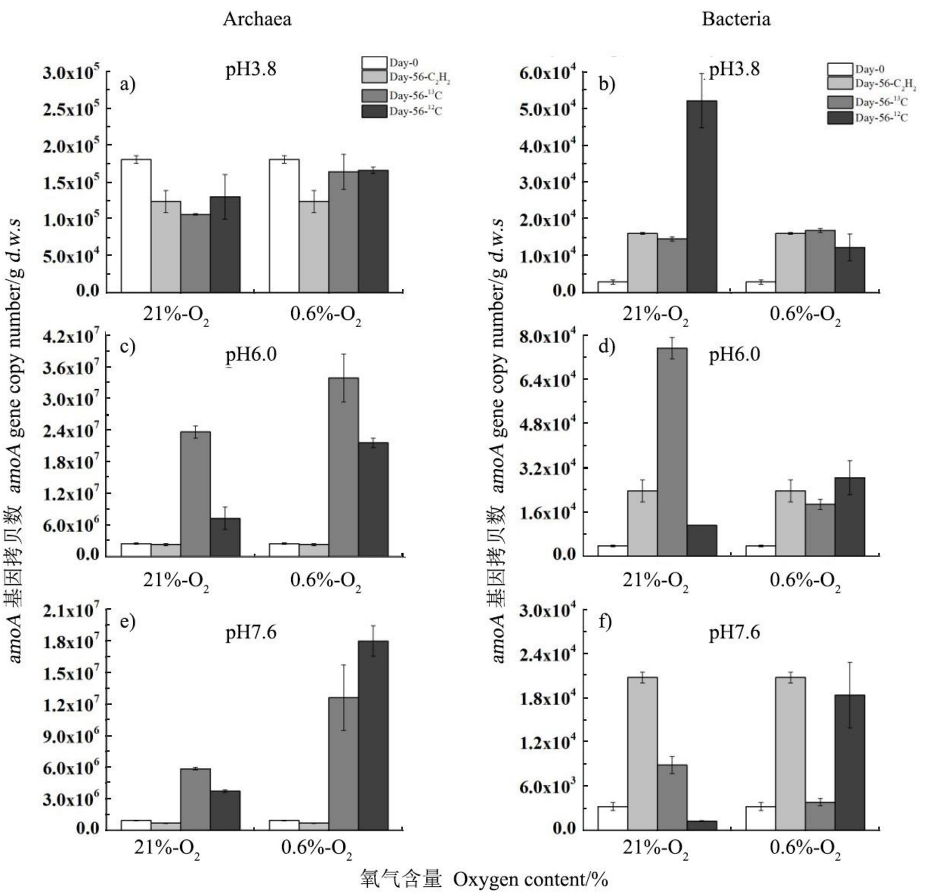
Fig. 1 Soil NO_3^--N (a,c,e), NH $_4^+$-N (b,d,f) concentration changes under different treatments

2.2 pH 和氧气浓度对氨氧化微生物丰度的影响

pH 和氧气浓度对氨氧化古菌的影响如图 2（a,c,e）所示，添加尿素底物培养 56 d 后，高氧环境下，pH3.8 处理样品中，$^{13}CO_2$、$^{12}C\ O_2$2 个处理氨氧化古菌 *amoA* 基因拷贝数分别为 1.06×10^5、1.30×10^5 copies·g^{-1} 干土，与零时刻 1.85×10^5 copies·g^{-1} 干土相比，变化不大，甚至有所下降。低氧处理的 $^{13}CO_2$、$^{12}CO_2$ 2 个处理 *amoA* 基因拷贝数分别为 1.64×10^5、1.66×10^5 copies·g^{-1} 干土，与零时刻 1.81×10^5 copies·g^{-1} 干土相比无明显变化。而高氧环境中，pH6.0 和 7.6 处理样品中，$^{13}CO_2$、$^{12}CO_2$ 2 个处理氨氧化古菌 *amoA* 基因拷贝数分别为 2.37×10^7、7.23×10^6 copies·g^{-1} 干土和 5.86×10^6、3.74×10^6 copies·g^{-1} 干土，与零时刻 2.40×10^6 copies·g^{-1} 干土和 9.34×10^5 copies·g^{-1} 干土相比，分别增长了 10 倍和 6 倍。低氧处理的 $^{13}CO_2$、$^{12}CO_2$ 2 个处理 *amoA* 基因拷贝数分别为 3.39×10^7、2.16×10^7 copies·g^{-1} 干土和 1.26×10^7、1.80×10^7 copies·g^{-1} 干土，与零时刻的 2.40×10^6 copies·g^{-1} 干土和增长了 14 倍和 5 倍，且低氧处理拷贝数高于高氧处理。以上处理的 $^{13}CO_2+C_2H_2$ 子处理与对应背景土壤 *amoA* 基因拷贝数差别不大，说明乙炔有效抑制了氨氧化古菌的生长。

pH 和氧气浓度对氨氧化细菌的影响如图 2（b,d,f）所示, 添加尿素底物培养 56 d 后，高氧环境下，pH3.8、pH6.0 处理样品中，$^{13}CO_2$、$^{12}CO_2$ 2 个处理氨氧化细菌 *amoA* 基因拷贝数

分别为 1.46×10^4、5.22×10^4 copies·g^{-1} 干土和 7.55×10^4、1.12×10^4 copies·g^{-1} 干土，与零时刻 2.86×10^3 copies·g^{-1} 干土和 3.75×10^3 copies·g^{-1} 干土相比，有所增加，但增长绝对值不高。pH7.6 处理样品中 $^{13}CO_2$、$^{12}CO_2$ 2 个处理氨氧化细菌 *amoA* 基因拷贝数分别为 8.89×10^3、1.25×10^3 copies·g^{-1} 干土，与零时刻 3.25×10^{3}copies·g^{-1} 干土相比，变化不大。低氧环境下，pH3.8 处理样品中，$^{13}CO_2$、$^{12}CO_2$ 2 个处理 *amoA* 基因拷贝数分别为 1.69×10^4、1.23×10^4 copies·g^{-1} 干土，与零时刻的 2.86×10^3 copies·g^{-1} 干土相比有所增加，但幅度不大。pH6.0、pH7.6 处理样品中，$^{13}CO_2$、$^{12}CO_2$ 2 个处理 *amoA* 基因拷贝数分别为 1.88×10^4、2.85×10^4 copies·g^{-1} 干土和 3.84×10^3、1.84×10^4 copies·g^{-1} 干土，与零时刻的 3.75×10^3 copies·g^{-1} 干土和 3.25×10^3 copies·g^{-1} 干土相比有所增长，且高氧处理拷贝数高于低氧处理。



注：$^{13}C + C_2H_2$，^{13}C，^{12}C 三个处理，每个处理三个重复；图表中的误差线表示三个真重复的计算值。Note: There are three treatments of $^{13}C + C_2H_2$, ^{13}C and ^{12}C, each with three repetitions; the error bars in the chart represent the calculated values of three true repetitions.

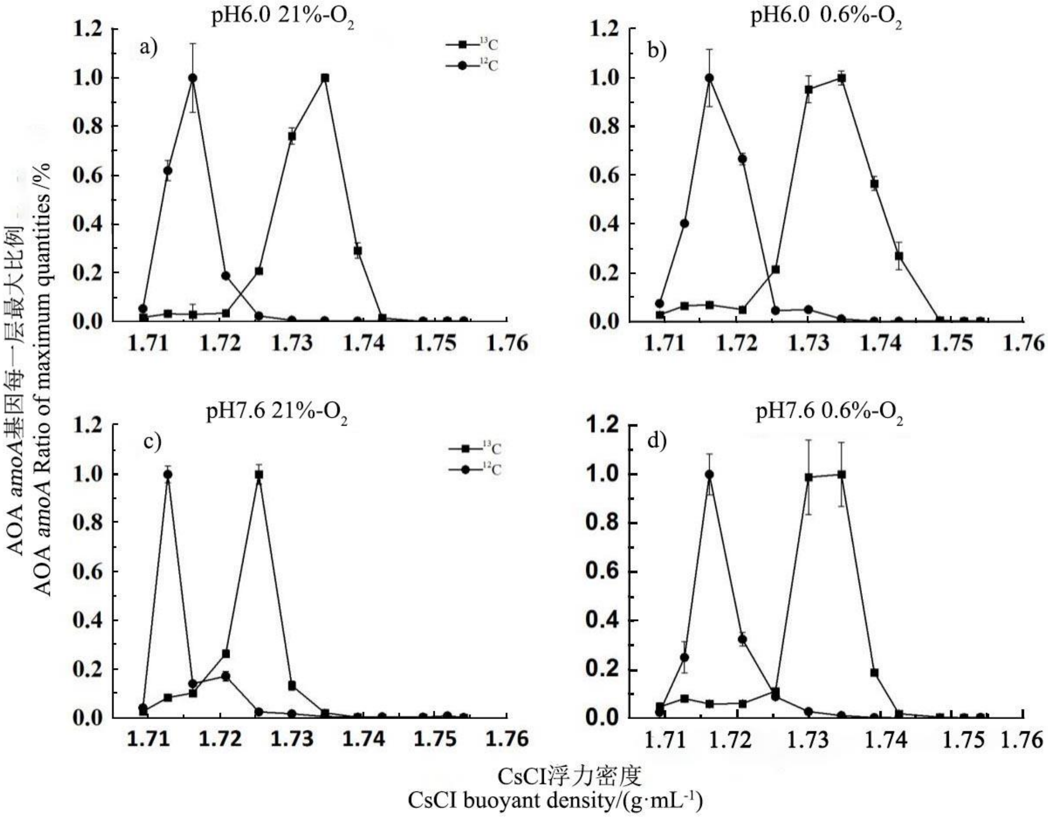
图 2 不同处理下土壤 AOA（a, c, e）和 AOB（b, d, f）*amoA* 基因拷贝数

Fig. 2 Copy numbers of AOA (a, c, e) and AOB (b, d, f) *amoA* genes in soil under different treatments

2.3 活性氨氧化微生物

对不同处理土壤进行 DNA-SIP 培养后，对硝化作用强烈且氨氧化微生物有明显增长的 pH6.0 和 7.6 的高氧和低氧环境 4 个样品进行氯化铯密度梯度超高速离心，将在培养过程中 $^{13}CO_2$ 标记的活性微生物 DNA 与未标记的微生物 ^{12}C-DNA 分离开来。对获得的从轻层到重层 DNA 进行 *amoA* 基因定量比较各层中氨氧化微生物的分布来判断活性氨氧化微生物的标记情况。如图 3 所示，pH6.0 和 7.6 的高氧和低氧环境 4 个样品的 $^{13}CO_2$ 处理古菌 *amoA*

基因在重层高度富集，而 $^{13}CO_2$ 对照处理的古菌 *amoA* 基因都集中在轻层，说明在 4 个样品中 AOA 参与了氨氧化过程。对 AOB 的 *amoA* 基因做同样的离心分层，定量后未发现有 ^{13}C-DNA 在重层富集，说明细菌没有参与氨氧化，这 4 个土壤的氨氧化过程由古菌主导。图 3c 中，pH7.6 高氧处理样品在分层过程中，可能每层样品总体积分离得偏少，导致重层样品总体向轻层偏移。



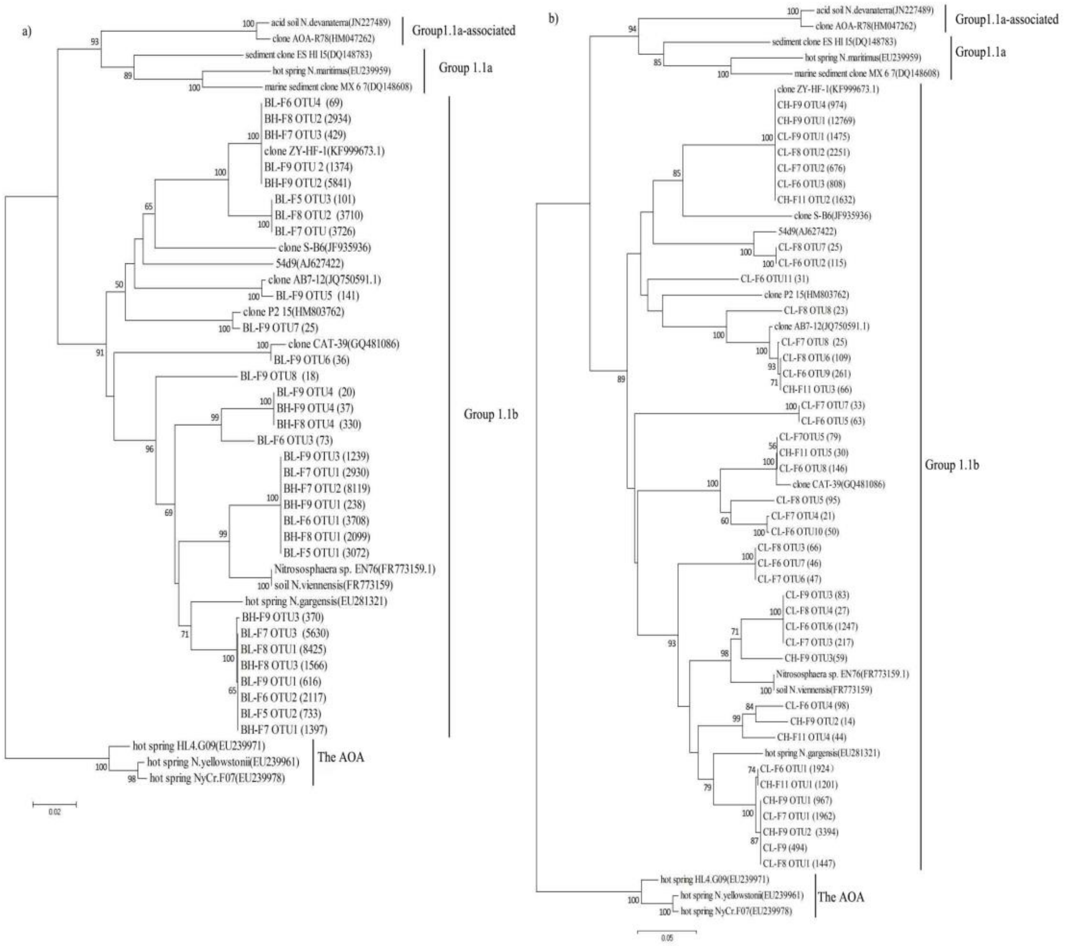
注：误差线表示三个真重复的计算值。Note:The error bars represent the calculated value of three true repetitions

图3 不同处理样品分层后每层中AOA *amoA*基因在各层的相对丰度

Fig. 3 The relative abundance of the AOA *amoA* gene in each layer after different treatment samples are stratified

2.4 pH 和氧气浓度对氨氧化古菌群落结构的影响

采用 DNA-SIP 和高通量相结合的方法，对 $^{13}CO_2$ 标记处理通过分层得到的重层 DNA 进行基于氨氧化古菌 *amoA* 基因的 454 高通量测序。对获得的序列利用 morhur 序列进行分析，为保证结果的可靠性，删除小于总序列 0.5%的 OTU。再利用 MEGA 软件对这些 OTU 结果进行分析，得到如图 4 的发育树。从图中可以看出，pH6.0（图 4a）和 7.6（图 4b）的高氧和低氧环境 4 个样品的 $^{13}CO_2$ 标记处理重层几乎全部是土壤类群 Group1.1b，森林土占重要地位的海洋类群 Group1.1-associated 在混合土壤中没有出现在重层，即没有被 ^{13}C 标记上，土壤类古菌主导了 pH6.0 和 7.6 样品高氧和低氧条件下的氨氧化作用。



注：“BL-F6 OTU4（69）”表示OTU4中的样品来自低氧环境下pH6.0样品的第六部分，具有69个序列；“CH-F9 OTU4（974）”表示OTU4中的样品来自高氧气环境下pH7.6样品的第九部分，具有974个序列；比例尺表示每100个核苷酸位置5个变化；自举值高于50%表示在分支点。Note: "BL-F6 OTU4 (69)" means that the sample in OTU4 comes from the sixth part of the pH 6.0 sample under hypoxic environment, with 69 sequences; "CH-F9 OTU4 (974)" means that the sample in OTU4 comes from The ninth part of the pH7.6 sample under high oxygen environment has 974 sequences; the scale bar represents 5 changes per 100 nucleotide positions; the bootstrap value higher than 50% indicates that it is at the branch point.

图4 不同处理样品DNA-SIP培养实验中通过密度梯度离心得到的重层中 ^{13}C-DNA基于氨氧化古菌 *amoA* 基因454测序的系统发育树

Fig. 4 The ^{13}C-DNA in the double layer obtained by density gradient centrifugation in the DNA-SIP culture experiment of different processed samples is based on the phylogenetic tree of ammonia-oxidizing archaea *amoA* gene 454 sequencing

3 讨 论

2011年，Lehtovirta-Morley等[16]从酸性土壤中分离出一株氨氧化古菌*Nitrosotalea devanaterra*，第一次直接证实了耐酸性AOA在环境中的存在，并能在氨分子浓度低至0.18 nmol·L^{-1}的情况下进行氨氧化。同时在碱性条件下，也不断发现AOA存在，并参与甚至主导土壤氨氧化[9]。氨氧化古菌主要由海洋类酸性簇Group I.1a associated 和土壤类Group I.1b两

大类组成，其中Group I.1a associated主要分布于酸性土壤，其相对丰度随pH升高而降低；Group I.1b主要分布于中碱性土壤，与土壤pH呈正相关关系[15]。

pH是影响硝化作用的关键因子[17]。本次研究中选取的两种土壤样品一种为酸性森林土，一种为碱性水稻土，酸性森林土由海洋类古菌主导，碱性水稻土由土壤类古菌与氨氧化细菌主导。两种土壤等干重混合后，加$^{13}CO_2$标记培养，高氧环境下，pH6.0和7.6样品均由土壤类古菌主导氨氧化过程，而pH3.8样品没有硝化活性，表明pH显著影响了氨氧化微生物活性，而土壤类古菌对pH的适应能力强于类海洋古菌。而本来在酸性森林土中有活性的Group I.1a associated，在混合土壤pH3.8样品中没有发挥作用，可能是因为土壤混合后，改变了土壤质地，对Group I.1a associated活性产生影响。本研究表明土壤类古菌在pH6.0、7.6土壤中的适应性较海洋类古菌强。这与土壤类Group I.1b主导中性或碱性环境相符。土壤类古菌的代谢活性比类海洋古菌高。类海洋古菌具有极高的氨氮亲和性，对NH_3的半饱和常数K_m仅为3 nmol·L^{-1},且对氨氮的耐受程度低，在pH中性的条件下，2 mmol·L^{-1}的氨氮即可抑制其生长。而土壤类古菌Km是类海洋古菌的几十甚至数百倍，氨氮耐受能力更强[2]。Nicol等[6]观察到土壤类AOA的四个主要进化支中。其中两个进化支（i和iii）仅由高pH（pH7.5）曲线中的序列表示。另外两个进化支（ii和iv）以pH 4.9序列为主。而类海洋古菌观察到进化支（v）仅由低pH序列表示。在此研究中类海洋古菌为严格的耐酸菌株，在中性pH下可能无法被标记。而土壤类古菌代谢活性高，氨氮耐受能力强。在pH6.0、7.6中为优势菌群。

土壤AOA不仅在中碱性土壤中占主导地位，也主导酸性土壤硝化作用。Gubry-Rangin等[18]发现某些土壤类古菌能适应低pH生长。刘亮霆[2]发现土壤样品pH在5.07~6.60之间，丰度最高的是土壤类Group I.1b。Wang等[19]在研究酸性土壤中的氨氧化古菌时发现，^{13}C标记的古细菌16S rRNA完全属于土壤类古菌，高达87.5％酸性土壤中有土壤类古菌适应性生长，表明土壤类Group I.1b的新陈代谢比以前的研究更有价值。土壤类古菌有更高的新陈代谢，主导了酸性农田土壤氨氧化过程。周雪等[20]发现pH小于6.07的五种风干森林土壤中，土壤类古菌为主要菌群。相对于类海洋古菌，土壤类古菌具有更高的代谢活性，高氨氮耐受能力，且土壤类古菌的基因组要明显大于类海洋古菌的基因组[21]。土壤类AOA在农业土壤，贫富营养草地，林地土壤，石灰石土壤，多年冻土上土壤和在冰川环境中生长的土壤中广泛存在[22]。因此土壤类Group I.1b在全球氮循环中有其独特的生态意义。

氧气是氨氧化作用的基质，其浓度的高低对氨氧化微生物产生选择。研究表明，AOA比AOB对氧气更具亲和力，在低氧环境中更具竞争优势。Jia和Conrad[23]研究发现在中国农田土壤表层（0~10 cm）AOA和AOB相对丰度的比值在1~10之间，而在深层土壤中（40~50 cm），其比值增加到了1000以上。对沉积物、水稻土研究表明，土壤类古菌是其优势氨氧化古菌。Wang等[24]对4中水稻土的研究发现，两种土壤中AOA参与了氨氧化作用，且均为土壤类古菌。Liu等对三峡库区消落带研究发现，绝大部分氨氧化古菌为土壤类古菌[25]，在钱塘江底泥中发现土壤类氨氧化古菌主导其氨氧化作用[26]。在此研究中，pH6.0和7.6样品中，高氧条件下的硝化通量高于低氧，而AOA的*amoA*基因相对丰度低氧条件下的高于高氧条件；对各处理样品DNA进行高速密度梯度离心分层结果表明，AOA同化了^{13}C，主导了氨氧化过程；对离心样品重层454测序结果表明土壤类古菌是占绝对优势，即土壤类古菌主导了pH6.0和7.6样品高氧和低氧条件下的氨氧化作用，这一结果表明，土壤类古菌可能适应较为宽泛的氧气浓度范围。

4 结 论

pH对硝化作用的影响大于氧气，是硝化作用的关键影响因子。样品中，低pH下没有硝

化作用发生，而pH6.0和7.6发生了强烈硝化作用，高氧环境下硝化作用强于低氧环境。土壤类古菌在中碱性土壤中的高氧和低氧环境有活性，较类海洋古菌具有更强的适应性。底物培养后，氨氧化古菌数量明显增加，pH6.0和7.6高氧和低氧样品中活性氨氧化古菌几乎全为土壤类古菌Group 1.1b。

参考文献（References）

[1] Sauder L A, Albertsen M, Engel K, et al. Cultivation and characterization of Candidatus Nitrosocosmicus exaquare, an ammonia-oxidizing archaeon from a municipal wastewater treatment system[J]. The ISME Journal, 2017, 11(5): 1142-1157.

[2] Liu L T. Enrichment and characteristics of soil ammonia-oxidizing archaea and its mechanism of high ammonia tolerance[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019. [刘亮霆. 土壤氨氧化古菌的富集、特性及耐高氨氮机制研究[D].广州：华南理工大学，2019.]

[3] 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.

[4] Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(3): 626-631.

[5] Lauber C L, Strickland M S, Bradford M A, et al. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(9): 2407-2415.

[6] Nicol G W, Leininger S, Schleper C, et al. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(11): 2966-2978.

[7] Yao H Y, Gao Y M, Nicol G W, et al. Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(13): 4618-4625.

[8] 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.

[9] Wang Y F, Gu J D. Effects of allylthiourea, salinity, and pH on ammonia/ammonium-oxidizing proka ryotes in mangrove sediment incubated in laboratory microcosms[J].Applied Microbiology and Biotech nology，2014，98(7)：3257-3274.

[10] Xia W W, Zhang C X, Zeng X W, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil[J]. The ISME Journal, 2011, 5(7): 1226-1236.

[11] Jung J, Yeom J, Kim J, et al. Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils[J]. Research in Microbiology, 2011, 162(10): 1018-1026.

[12] Kim J G, Jung M Y, Park S J, et al. Cultivation of a highly enriched ammonia-oxidizing archaeon of thaumarchaeotal group I.1b from an agricultural soil[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(6): 1528-1543.

[13] Abell G C J, Banks J, Ross D J, et al. Effects of estuarine sediment hypoxia on nitrogen fluxes and ammonia oxidizer gene transcription[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 75(1): 111-122.

[14] Pett-Ridge J, Petersen D G, Nuccio E, et al. Influence of oxic/anoxic fluctuations on ammonia oxidizers and nitrification potential in a wet tropical soil[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 85(1): 179-194.

[15] He J Z, Zhang L M. Key processes and microbial mechanisms of soil nitrogen transformation[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 98-108. [贺纪正，张丽梅. 土壤氮素转化的关键微生物过程及机制[J]. 微生物学通报，2013, 40(1): 98-108.]

[16] 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.

[17] Tian M, Guo J, Li J, et al. Effects of long-term fertilization on the abundance and composition of ammonia-

oxidizing archaea and bacteria in paddy soil profiles[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021. DOI: 10.11766/trxb202007140240. [田美洁，郭俊丽，黎娟，等. 长期施肥对水稻土剖面氨氧化古菌和细菌丰度及组成的影响[J]. 土壤学报, 2021. DOI: 10.11766/trxb202007140240.]

[18] 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.

[19] 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.

[20] Zhou X, Huang R, Song G, et al. Restoration of microbial ammonia oxidizers in air-dried forest soils upon wetting[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(11): 1311-1322. [周雪，黄蓉，宋歌，等. 风干土壤中氨氧化微生物的恢复[J]. 微生物学报, 2014, 54(11): 1311-1322.]

[21] Ayton J, Aislabie J, Barker G M, et al. Crenarchaeota affiliated with group 1.1b are prevalent in coastal mineral soils of the Ross Sea region of Antarctica[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(3): 689-703.

[22] Nicol G W, Tscherko D, Chang L S, et al. Crenarchaeal community assembly and microdiversity in developing soils at two sites associated with deglaciation[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(8): 1382-1393.

[23] 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.

[24] Wang B Z, Zhao J, Guo Z Y, et al. Differential contributions of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers to nitrification in four paddy soils[J]. The ISME Journal, 2015, 9(5): 1062-1075.

[25] Liu S, Hu B L, He Z F, et al. Ammonia-oxidizing Archaea have better adaptability in oxygenated/hypoxic alternant conditions compared to ammonia-oxidizing bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(20): 8587-8596.

[26] Liu S, Shen L D, Lou L P, et al. Spatial distribution and factors shaping the niche segregation of ammonia-oxidizing microorganisms in the Qiantang River, China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(13): 4065-4071.

（责任编辑：卢 萍）