

张洁, 宋怡轩, 张鑫磊, 等. 不同类型稻田中全程氨氧化微生物的分异特征[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(3): 584-590.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2020.03.008

不同类型稻田中全程氨氧化微生物的分异特征

张洁^{1,2}, 宋怡轩^{1,2}, 张鑫磊^{1,3}, 张耀鸿¹

(1. 南京信息工程大学, 气象灾害预报预警与评估协同创新中心/江苏省农业气象重点实验室, 江苏 南京 210044; 2. 中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 210008; 3. 山西省气候中心, 山西 太原 030006)

摘要: 选用微碱性氮贫瘠的上海市崇明岛稻田和微酸性氮丰富的南京市稻田剖面(0~50 cm), 比较研究稻田土壤中氨氧化微生物类群丰度的差异及其环境驱动机制, 评价其与氨氧化潜力的内在关系。结果表明, 崇明稻田的净硝化速率为12.82~22.30 mg/(kg·d), 明显高于南京稻田[4.26~7.46 mg/(kg·d)]。崇明稻田土壤剖面的Comammox *amoA* 基因总拷贝数(Clade A 与 Clade B 之和)均值为1 g 8.8×10⁶拷贝, 是南京稻田的2.4倍, 且 Clade A 与 Clade B 的比值范围为2.5~12.7, 证实了 Comammox 存在于2种不同类型的稻田土壤中。崇明稻田和南京稻田剖面的氨氧化细菌(AOB)的 *amoA* 基因拷贝数均值分别为1 g 3.75×10⁸拷贝和1.23×10⁸拷贝, 氨氧化古菌(AOA)的 *amoA* 基因拷贝数均值分别为1 g 2.05×10⁷拷贝和0.35×10⁷拷贝, 这2种菌群基因拷贝数均在10.1~20.0 cm 土层达到最高。回归分析发现, 2个稻田中氨氧化细菌(AOB)对氨氧化潜力的贡献率达到90%~94%, 而 Comammox 仅为3%左右, 表明氨氧化细菌(AOB)在氨氧化过程中发挥主要作用。

关键词: 稻田; 全程氨氧化细菌; 氨氧化细菌; 氨氧化古菌; 氨氧化潜力

中图分类号: S511.061 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)03-0584-07

Differentiation characteristics of complete ammonia-oxidizing microorganisms in different types of paddy soils

ZHANG Jie^{1,2}, SONG Yi-xuan^{1,2}, ZHANG Xin-lei^{1,3}, ZHANG Yao-hong¹

(1. Nanjing University of Information Science and Technology, Collaborative Innovation Center for Forecast and Evaluation of Meteorological Disasters/Jiangsu Provincial Key Laboratory of Agricultural Meteorology, Nanjing 210044, China; 2. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 3. Shanxi Climate Center, Taiyuan 030006, China)

Abstract: In this study, the alkaline coastal paddy field profile (0–50 cm) with low nitrogen and acidic Nanjing paddy field profile with high nitrogen were selected to compare the abundance of ammonia-oxidizing microorganisms in paddy soils and its environmental driving mechanism, and to evaluate its internal relationship with ammonium oxidation potential was evaluated. The results showed that the net nitrification rate of coastal paddy fields ranged from 12.82 mg/(kg·d) to 22.30 mg/(kg·d), which was significantly higher than that of Nanjing paddy fields [4.26–7.46 mg/(kg·d)]. The

average number of total copies of comammox *amoA* gene (the sum of Clade A and Clade B) in the soil profile of coastal paddy fields was 8.8×10⁶ copies per gram, which was 2.4 times greater than that of Nanjing paddy fields, confirming that comammox existed in two different types of paddy fields. In addition, the ratio of Clade A to Clade B ranged from 2.5 to 12.7. The average copy number of *amoA* gene of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in coastal

收稿日期: 2019-08-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(41671247、41103039); 江苏省自然科学基金项目(BK20171455); 江苏省大学生创新创业训练计划项目(201810300094X、201710300018)

作者简介: 张洁(1994-), 女, 安徽庐江人, 硕士研究生, 主要从事地气交换方面的研究。(E-mail) 1044909837@qq.com

通讯作者: 张耀鸿, (E-mail) yhzhang@nuist.edu.cn

and Nanjing paddy fields was 3.75×10^8 copies per gram and 1.23×10^8 copies per gram, respectively. The average copy number of *amoA* gene of ammonia-oxidizing archaea (AOA) was 2.05×10^7 copies per gram and 0.35×10^7 copies per gram, respectively. The abundance of these two bacteria were the highest in 10.0–20.0 cm soil layer. The results of regression analysis indicated that AOB contributed 90%–94% to the potential of ammonia oxidation in the two paddy fields, while comammox only contributed about 3%, indicating that AOB could play a major role in ammonia oxidation in the two soils.

Key words: paddy soils; complete ammonia oxidizers (comammox); ammonia-oxidizing archaea (AOA); ammonia-oxidizing bacteria (AOB); potential of ammonia oxidation

硝化作用是自然界氮循环的关键转化过程,也是农田土壤氮素循环的重要环节^[1]。氨氧化作用是硝化过程的第一步反应,也是整个过程的限速步骤。一直以来,普遍认为变形菌纲的氨氧化细菌(AOB)是其唯一承担者,直到氨氧化古菌(AOA)被发现^[2],才证实了氨氧化过程是由AOB和AOA两类微生物共同承担。

根据经典动力学理论计算,一种微生物独自将 NH_3 氧化为亚硝酸盐,再继续氧化为硝酸盐的两步氧化过程是可行的^[3]。2015年底,科学家在水生生态系统中发现了全程氨氧化微生物(Complete ammonia oxidizers, Comammox),能够直接完成从 NH_4^+ 到 NO_3^- 的氧化^[4-5]。新近的研究结果证实,Comammox广泛存在于农田土壤、自然湿地、河流沉积物、废水污泥和饮用水处理系统中^[4-7]。但是,Comammox对氨氧化速率的贡献以及与传统的AOA和AOB如何相互竞争/共存及其相对重要性,仍不清楚,是目前研究的热点。

稻田土壤因受到施肥、淹水、农业耕作等因素的影响,其氨氧化及硝化作用非常强烈。有报道认为,稻田土壤中 NH_3 浓度的变化可能是驱动Comammox和AOA及AOB的关键环境因子^[8]。受农业施肥的影响,稻田土壤中的活性N水平差异极大;且施肥往往会导致土壤酸化,深刻影响着活性N尤其是 NH_4^+ 的存在形态。受 H^+ 介导的化学平衡影响,酸性土壤中 NH_3 浓度通常远低于中性和碱性土壤^[9]。经典AOA和AOB的氨单加氧酶只能催化非离子态氨(NH_3),而不能催化离子态铵(NH_4^+)^[10];而Comammox是否也只能氧化非离子态氨仍不清楚。许多研究者认为,AOA对 NH_3 的亲合力远高于AOB^[11]。因此AOA通常主导酸性土壤氨氧化^[12],而AOB则在中性和碱性土壤中发挥作用^[13-14]。而最新的研究结果则表明,全程氨氧化细菌对 NH_3 的亲合力远高于大多数可培养的AOA,能够更好地适

应于极低 NH_3 浓度的胁迫环境^[15]。然而,在不同pH值、不同活性N水平的稻田土壤环境中,Comammox和AOA、AOB对稻田土壤氨氧化速率的相对贡献仍不清楚。

因此,本试验选取2个不同类型的稻田——微碱性N贫瘠的长江口崇明稻田和微酸性N丰富的南京稻田,研究这2个稻田土壤剖面的氨氧化潜势及各类氨氧化微生物的丰度,揭示两者之间的内在关系。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

采样地点为上海市崇明岛围垦稻田(31.50°N , 121.92°E)和南京信息工程大学农业气象试验站稻田(32.16°N , 118.86°E)。两个稻田都处于北亚热带湿润气候区,年均降水量1 000~1 100 mm,年均气温 15.6°C 。在每个稻田内以S形设置6个采样点,各采样点间距约为10~15 m,用土钻取0~10.0 cm、10.1~20.0 cm、20.1~35.0 cm、35.1~50.0 cm的土层鲜土,并将相同深度土层的土样充分混合,放入冰盒中运回实验室冷冻保存备用。

1.2 土壤理化性质测定

土壤全氮(TN)含量采用半微量凯氏定量法测定。土壤总有机碳(TOC)含量采用浓硫酸-重铬酸钾消煮-硫酸亚铁滴定法测定。土壤铵态氮和硝态氮含量用2 mol/L KCl溶液浸提后,采用AA3流动分析仪测定。土壤pH采用水土比为2.5:1.0(质量比)提取水溶液后,用数字酸度计测定。

用净硝化速率反映稻田剖面土壤的好氧氨氧化潜力。净硝化速率的测定采用好气培养法。取沉积物土样10 g(干基),加15 ml去离子水,将土样分散均匀,形成悬浊液。称取总质量并记录。 25°C 避光预培养7 d以便激活土壤微生物。预培养结束后,将每个土样分为2组:第1组的3个锥形瓶,直接测

定正式培养起始时刻(t_0)的硝态氮浓度。第 2 组的 6 个锥形瓶中,用移液枪加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液使 N 最终浓度达到 200 mg/L,再根据质量法补加去离子水,使之去离子水总量为 20 ml,然后在恒温培养箱中 25 ℃避光培养 7 d(t)后,取出锥形瓶,测定其中的硝态氮浓度。硝化速率的计算公式为: $N = [(\text{NO}_3^-)_t - (\text{NO}_3^-)_{t_0}] / (t - t_0)$,式中, N 为硝化速率,单位为 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, $(\text{NO}_3^-)_t$ 和 $(\text{NO}_3^-)_{t_0}$ 分别为 t d 和 0 d 时 NO_3^- -N 含量。

1.3 土壤 DNA 提取

利用 Fast DNA Spin kit for soil 提取试剂盒 (MP Biomedicals, USA) 提取土壤样品中的总 DNA。取 0.5 g 土壤样品,按试剂盒说明书的步骤提取 DNA,取部分 DNA 提取液用分光光度计 (NanoDrop -1000 UV-Vis) 测定 DNA 浓度和纯度。土壤 DNA 保存于 -80 ℃冰箱待用。

1.4 实时荧光定量 PCR

在 C1000™ Real-Time System 扩增仪上进行实时荧光定量 PCR 扩增。测定氨氧化古菌(AOA)、氨氧化细菌(AOB)和全程氨氧化细菌分支 A 与分支 B (Comammox Clade A 与 Comammox Clade B) 的 *amoA* 基因拷贝数。AOB、AOA、Comammox 的 *amoA* 基因定量 PCR 所用扩增引物和扩增条件参照文献 [16]、[17] 和 [18]。反应体系均为 20.0 μl ,包括 DNA 样品 1.0 μl 、*Taq* DNA 聚合酶 10.0 μl 、前后引物各 0.5 μl 、无菌水 8.0 μl 。提取氨氧化微生物的 *amoA* 基因的重组质粒,并进行测序验证,再用分光

光度计 (NanoDrop ND-1000 UV-Vis) 测定质粒浓度,并用无菌水将质粒稀释 6~8 个梯度,用于制作定量 PCR 的标准曲线,根据标准曲线计算目的基因的拷贝数。

1.5 数据统计分析

用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,通过单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Pearson 分析进行土壤理化性质、氨氧化微生物丰度的差异性以及相关检验,显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同类型稻田土壤的理化性质

南京稻田和崇明稻田剖面的土壤理化性质如表 1 所示。南京稻田土壤剖面中 NH_4^+ 和 NO_3^- 含量范围分别为 8.6~9.6 mg/kg 和 13.1~17.8 mg/kg,明显高于崇明稻田土壤剖面,且随土壤深度的变化较小。而崇明稻田剖面中 NH_4^+ 和 NO_3^- 含量变化幅度较大,表现为 0~10.0 cm 土层的硝态氮含量显著高于底层,其垂直分布特征与南京稻田土壤明显不同。南京稻田的 TN 和 TOC 均值分别为 1.72 g/kg 和 18.68 g/kg,分别是崇明稻田的 3.3 倍和 2.9 倍。南京稻田剖面的 pH 值为 6.3~6.5,崇明稻田剖面的 pH 值为 7.6~7.9。总体而言,南京稻田为微酸性氮丰富土壤,且活性氮和总氮含量随剖面深度增加而变化较小;崇明稻田为微碱性氮贫瘠土壤,且表层土壤活性氮和总氮含量显著高于底层土壤。这为进一步深入分析两个稻田的氨氧化过程提供了很好的试验材料。

表 1 不同稻田土壤的理化性质

Table 1 Physicochemical properties of different paddy soils

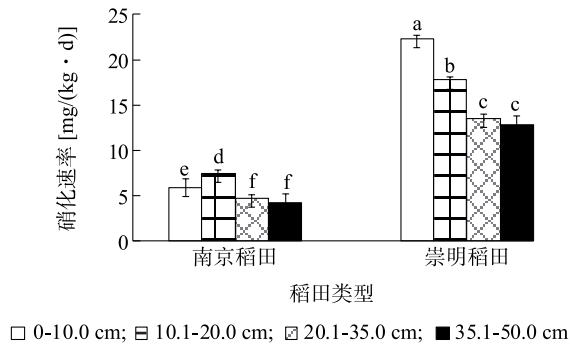
采样深度 (cm)	NH_4^+ 含量 (mg/kg)		NO_3^- 含量 (mg/kg)		TN 含量 (g/kg)		TOC 含量 (g/kg)	
	南京	崇明	南京	崇明	南京	崇明	南京	崇明
0~10.0	9.6±1.1a	5.5±0.9a	16.4±1.2a	8.9±1.1a	1.84±0.17a	0.77±0.15a	20.6±2.4a	9.5±1.3a
10.1~20.0	9.2±1.1ab	3.2±0.5b	15.7±0.7a	5.1±0.6b	1.68±0.11ab	0.48±0.08b	19.8±2.7a	5.2±0.3b
20.1~35.0	8.8±1.9bc	3.1±0.5b	17.8±1.2a	4.2±0.5bc	1.81±0.12a	0.43±0.02b	18.9±3.5a	5.3±0.2b
35.1~50.0	8.6±0.3c	2.7±0.5b	13.1±0.6b	3.7±0.6c	1.55±0.14b	0.39±0.01b	15.4±1.5b	5.1±0.2b

TN:土壤全氮;TOC:土壤总有机碳。同一列不同字母表示在 0.05 水平差异显著。

2.2 不同类型稻田土壤的硝化速率

图 1 显示,南京稻田的硝化速率为 4.26~7.46 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,其中,10.1~20.0 cm 土层的土壤硝化速率显著高于深层。崇明稻田的硝化速率为 12.82~22.30 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,表现为表层硝化速率

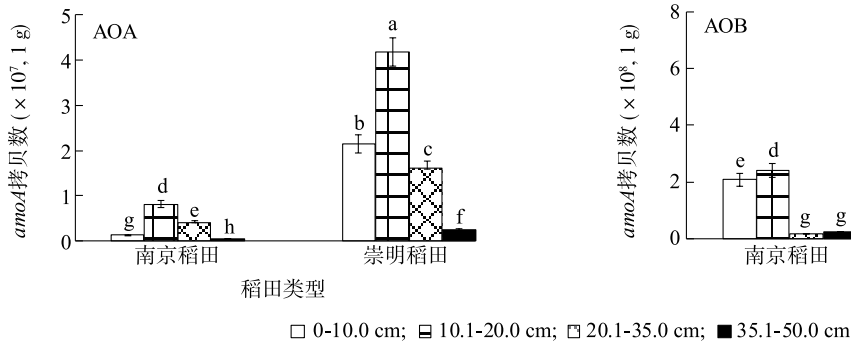
最高,随深度增加而逐渐减小。相关性分析发现,两个稻田的硝化速率与土壤氨态氮含量呈显著正相关,相关系数分别为 0.66* 和 0.92*,与土壤 TOC 也呈显著正相关,相关系数分别为 0.70* 和 0.87*。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图1 不同类型稻田土壤的硝化速率

Fig.1 Nitrification rate of different paddy soils



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图2 不同稻田土壤氨氧化古菌 (AOA) 和氨氧化细菌 (AOB) *amoA* 功能基因拷贝数

Fig.2 The abundance of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) *amoA* genes in different paddy soils

2.4 不同类型稻田土壤的全程氨氧化细菌丰度特征

由图3可知,两个稻田土壤中全程氨氧化细菌 Comammox Clade A 的丰度差异很大。南京稻田和崇明稻田土壤的 Comammox Clade A *amoA* 基因拷贝数均值分别为 1 g 0.29×10^7 拷贝和 0.87×10^7 拷贝,其中,在 10.1~20.0 cm 土层达到最高,分别为 1 g 0.73×10^7 拷贝和 1.97×10^7 拷贝。两个稻田剖面的 Comammox Clade B *amoA* 基因拷贝数均值分别为 1 g 0.75×10^6 拷贝和 1.04×10^6 拷贝,其中,也在 10.1~20.0 cm 土层达到最高,分别为 1 g 2.15×10^6 拷贝和 2.22×10^6 拷贝。通过相关性分析发现,两个稻田剖面中全程氨氧化细菌 Comammox Clade A 与 Comammox Clade B 的 *amoA* 基因拷贝数均呈显著正相关,相关系数分别为 0.98* 和 0.94*。

2.5 不同类型稻田土壤氨氧化微生物拷贝数比较及对氨氧化速率的贡献

对南京稻田和崇明稻田土壤的氨氧化微生物拷

2.3 不同类型稻田土壤的氨氧化细菌和古菌丰度特征

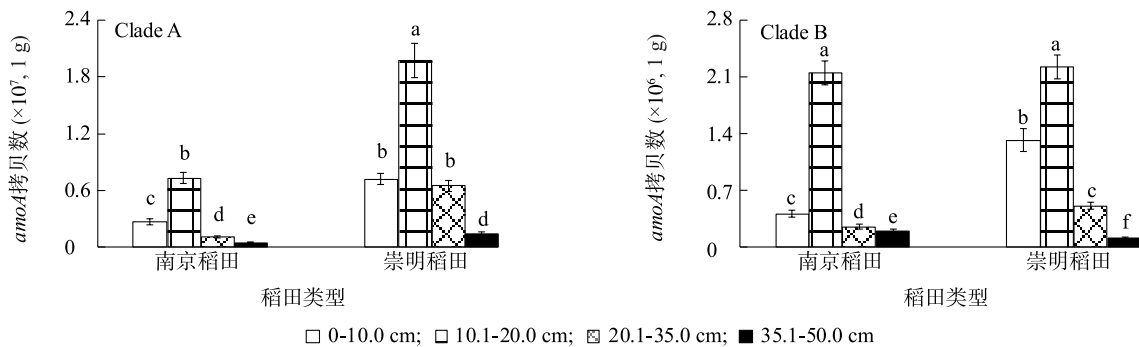
由图2可知,南京稻田和崇明稻田的氨氧化古菌 (AOA) 的 *amoA* 基因拷贝数 (以干土计) 均值分别为 1 g 0.35×10^7 拷贝和 2.05×10^7 拷贝,其中,在 10.1~20.0 cm 土层最高,分别为 1 g 0.82×10^7 拷贝和 4.18×10^7 拷贝。两个稻田土壤的氨氧化细菌 (AOB) 的 *amoA* 基因拷贝数均值分别为 1 g 1.23×10^8 拷贝和 3.75×10^8 拷贝,其中,也在 10.1~20.0 cm 土层达到最高,分别为 1 g 2.41×10^8 拷贝和 6.21×10^8 拷贝。通过相关性分析发现,崇明稻田剖面中氨氧化古菌 (AOA) 与氨氧化细菌 (AOB) 的 *amoA* 基因拷贝数显著正相关,相关系数为 0.92*。

贝数进行比较。结果 (表2) 表明,两个稻田中氨氧化古菌 (AOA) 与全程氨氧化细菌的比值分别为 1.54 和 2.32,说明两者的拷贝数为同一数量级。相反,氨氧化细菌 (AOB) 与全程氨氧化细菌的比值均大于 40,而且氨氧化细菌 (AOB) 与氨氧化古菌 (AOA) 的比值也均大于 10,说明 3 类氨氧化微生物中,氨氧化细菌 (AOB) 的数量占有绝对优势。值得注意的是,两个稻田中全程氨氧化细菌 Clade A 与 Clade B 的比值均高于 1.0,说明 Clade A 在全程氨氧化细菌中数量上占有明显优势。

将各类氨氧化微生物 *amoA* 基因拷贝数与硝化速率进行线性回归分析 (表3),发现南京稻田和崇明稻田中,随土壤硝化速率的增加氨氧化细菌 AOB 的响应度均最大,其线性方程的斜率分别达到 7.67 和 2.54;其次是氨氧化古菌 (AOA),响应度最小的是全程氨氧化细菌 Clade A 和 Clade B。根据响应方程进一步计算氨氧化微生物对氨氧化速率的贡献

率,结果显示两个稻田中氨氧化细菌(AOB)对硝化速率的贡献率达到90%~94%,而全程氨氧化细菌

(Clade A+Clade B)的贡献率仅为2.9%~3.4%。



不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图3 不同类型稻田土壤全程氨氧化细菌(Comammox) *amoA* 功能基因拷贝数

Fig.3 The abundance of complete ammonia oxidizers (comammox) *amoA* genes in different paddy soils

表2 不同类型稻田中各氨氧化微生物 *amoA* 基因拷贝数之比

Table 2 Ammonia-oxidizing microorganisms *amoA* gene copy ratios under different paddy fields

采样点	AOA/ (Comammox Clade A+Clade B)	AOB/ (Comammox Clade A+Clade B)	Comammox Clade A/ Comammox Clade B	AOB/AOA
南京稻田	1.54	42.79	42.20	60.88
崇明稻田	2.32	45.39	99.50	19.23

AOA:氨氧化古菌;AOB:氨氧化细菌;Comammox Clade A:全程氨氧化细菌分支 A;Comammox Clade B:全程氨氧化细菌分支 B。

表3 硝化速率与氨氧化微生物功能基因 *amoA* 拷贝数之间的回归方程

Table 3 Regression relationship between nitrification rate (Y) and the copy number of ammonia-oxidizing microorganism *amoA* gene (x)

氨氧化菌	南京稻田		崇明稻田	
	回归方程	决定系数	回归方程	决定系数
AOA	$Y = 0.191x - 0.712$	0.810	$Y = 0.195x - 1.184$	0.375
AOB	$Y = 7.671x - 30.557$	0.884	$Y = 2.537x - 4.657$	0.410
Comammox Clade A	$Y = 0.212x - 0.893$	0.963	$Y = 0.068x - 0.251$	0.245
Comammox Clade B	$Y = 0.061x - 0.263$	0.866	$Y = 0.014x - 0.131$	0.644

AOA、AOB、Comammox Clade A、Comammox Clade B 见表 2 注。

3 讨论

已有研究结果表明,全程氨氧化微生物可能广泛分布于土壤、沉积物、水等生态环境中^[4-7]。本研究在微酸性氮丰富的南京稻田和微碱性氮贫瘠的崇明稻田土壤中,均检测出高数量级的全程氨氧化细菌(Comammox) *amoA* 基因拷贝数,分支 A (Comammox Clade A) 与分支 B (Comammox Clade B) *amoA* 基因拷贝数分别为 1 g $0.5 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$ 拷贝和 $1.1 \times 10^5 \sim 2.2 \times 10^6$ 拷贝,证实了全程氨氧化细菌与氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)一样,广泛分布于不同类型的稻田土壤中。而且,两个稻田土壤中

Comammox *amoA* 基因拷贝数(分支 A 与分支 B 之和)均值与 AOA 的数量级相同,说明全程氨氧化细菌可能在这两种类型的水稻土硝化过程中发挥着一定的作用。

一般认为,氨氧化过程是硝化反应的第一步,也是限速步骤^[19];氨氧化过程的反应底物为非离子态氨(NH_3)而不是离子态铵(NH_4^+)^[10],因此氨氧化过程是对 pH 高度敏感的典型生物学过程^[20]。酸性土壤中 NH_3 质量分数很低,所以一直以来科学家们认为硝化过程不能在酸性土壤中发生。但随后越来越多的证据表明酸性土壤中也存在硝化作用^[21],但普遍低于中性或碱性土壤。本试验中,微酸性南京

稻田土壤的硝化速率为 $5.58 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 仅为微碱性崇明稻田的 34%, 原因可能是 pH 值导致南京稻田中硝化底物 NH_3 含量降低而影响氨氧化作用, 最终硝化速率减小。此外, 已有许多研究结果表明, AOB 对氮肥更敏感, 高氮条件下土壤中氨氧化过程的主要承担者是 AOB 而非 AOA^[13-14]。本研究发

发现, 两个稻田土壤中, 氨氧化细菌 (AOB) *amoA* 基因拷贝数比 AOA 高出一个数量级, 而且对硝化速率的贡献率高达 90%~94%, 表明本试验稻田中氨氧化速率的主要贡献者是 AOB, 而非 AOA。

已有研究结果表明, 全程氨氧化细菌 (Comammox) 可能更适应低氮的贫营养环境。Kits 等通过氨氧化的动力学分析发现, 全程氨氧化细菌 (Comammox) 生长的氨底物 K_m 值仅为 $0.05 \mu\text{mol}/\text{L}$, 远低于氨氧化古菌的 K_m 值 ($0.7 \sim 4.4 \mu\text{mol}/\text{L}$), 表现出极强的氨底物捕获能力^[15]。此外, Palomo 等发现^[22], 全程氨氧化细菌 (Comammox) 能编码低氧、磷饥饿下高效表达的基因 *phoD*。本试验中, 尽管检测到全程氨氧化细菌 (Comammox) 存在于两个稻田中, 但对氨氧化潜力的贡献率仅为 3% 左右。Wang 等^[23] 对长期施肥 19 年农田中的全程氨氧化细菌进行分析, 发现全程氨氧化细菌对土壤氨氧化速率和亚硝酸盐还原速率的贡献极小, 认为 Comammox 对底物 NH_3 具有高亲和力, 而氨氧化速率很低, 非常适应于氨浓度极低的贫营养环境中, 但在长期施肥的农田中, 氨浓度远高于这类微生物的需求量, 其数量和酶促速率不随施肥量增加而增加, 表现出较小的氨氧化贡献率。本试验的崇明稻田母质尽管是河口沉积物, 土壤养分较为贫瘠, 但该围垦稻田已有 20 年左右的种稻施肥历史, 其土壤全氮和活性氮含量明显高于海堤之外的自然滩涂湿地^[24]。因此, 与其他养分贫瘠生态系统相比, 两个稻田中长期施肥导致的土壤氮含量增加, 可能是全程氨氧化细菌 (Comammox) 对氨氧化潜力贡献率降低的重要原因之一。

本研究中还发现, 两个类型稻田土壤中, 全程氨氧化细菌 (Comammox) Clade A 与 Clade B *amoA* 基因拷贝数的比值均大于 1.0, 最高达 12.7。Pjevac 等在意大利水稻土中检测到全程氨氧化细菌分支 A (Comammox Clade A) 的丰度明显高于分支 B (Comammox Clade B)^[25], 与本试验结果一致。王梅等报道在重庆中性紫色水稻土中全程氨氧化细菌以分

支 A (Comammox Clade A) 为主, 且 Comammox Clade A 对施肥更敏感, 随施肥量增加而增加, 而 Comammox Clade B 却无显著变化^[7]。本试验中两个类型稻田土壤中全程氨氧化细菌 (Comammox) 也是以分支 A (Comammox Clade A) 为主, 对硝化速率的贡献可能远高于分支 B (Comammox Clade B)。

参考文献:

- [1] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展[J]. 生态学报, 2009, 29(1): 406-415.
- [2] KNNEKE 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.
- [3] COSTA E, PÉREZ J, KREFT J U. Why is metabolic labour divided in nitrification? [J] Trends in Microbiology, 2006, 14(5): 213-219.
- [4] DAIMS H, LEBEDEVA E V, PJEVAC P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria[J]. Nature, 2015, 528(7583): 504-509.
- [5] 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.
- [6] PALOMO A, JANE F S, GÜLAY A, et al. Metagenomic analysis of rapid gravity sand filter microbial communities suggests novel physiology of *Nitrospira* spp [J]. ISME Journal, 2016, 10(11): 2569-2581.
- [7] 王 梅, 王智慧, 石孝均, 等. 长期不同施肥量对全程氨氧化细菌丰度的影响[J]. 环境科学, 2018, 39(10): 4727-4734.
- [8] 曹彦强, 王智慧, 莫永亮, 等. 施肥和淹水管理对水稻土氨氧化微生物数量的影响[J]. 土壤学报, 2019, 56(4): 1004-1011.
- [9] PROSSER J I, NICOL G W. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation [J]. Trends in Microbiology, 2012, 20(11): 523-531.
- [10] SUZUKI I, DULAR U, KWOK S C. Ammonia and ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts[J]. Journal of Bacteriology, 1974, 120(1): 556-558.
- [11] MARTENS-HABBENA W, BERUBE P M, URAKAWA H, et al. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria[J]. Nature, 2009, 461(7266): 976-979.
- [12] LU L, HAN W, ZHANG J, et al. Nitrification of archaeal ammonia oxidizers in acid soils is supported by hydrolysis of urea[J]. ISME Journal, 2012, 6(10): 1978-1984.
- [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] XIA W, ZHANG C, ZENG X, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil[J]. ISME Journal, 2011, 5(7): 1226-1236.

- [15] 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.
- [16] YU C, HOU L, ZHENG Y, et al. Evidence for complete nitrification in enrichment culture of tidal sediments and diversity analysis of clade a comammox *Nitrospira* in natural environments[J]. *Applied Microbiological Biotechnology*, 2018, 102: 9363-9377.
- [17] WANG M, HUANG G, ZHAO Z, et al. Newly designed primer pair revealed dominant and diverse comammox amoA gene in full-scale wastewater treatment plants[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 270: 580-587.
- [18] BEMAN J M, FRANCIS C A. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hyper-nitrified subtropical estuary: Bahía del Tóbari, Mexico[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(12): 7767-7777.
- [19] PROSSER J I. Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in microbial physiology*[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 1990, 30(1): 125-181.
- [20] DE BOER W, KOWALCHUK G A. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(7): 853-866.
- [21] DAHLGREN R A. Soil acidification and nitrogen saturation from weathering of ammonium-bearing rock[J]. *Nature*, 1994, 368(1): 838-841.
- [22] PALOMO A, PEDERSEN A G, FOWLER S J, et al. Comparative genomics sheds light on niche differentiation and the evolutionary history of comammox *Nitrospira*[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12: 1779-1793.
- [23] WANG J, WANG J L, RHODES G, et al. Adaptive responses of comammox *Nitrospira* and canonical ammonia oxidizers to long-term fertilizations; Implications for the relative contributions of different ammonia oxidizers to soil nitrogen cycling[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 668: 224-233.
- [24] 林黎, 崔军, 陈学萍, 等. 滩涂围垦和土地利用对土壤微生物群落的影响[J]. *生态学报*, 2014, 34(4): 899-906.
- [25] PJEVAC P, SCHAUBERGER 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: 1508-1514.

(责任编辑:张震林)