

氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展

贺纪正, 张丽梅*

(城市与区域生态国家重点实验室, 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要: 氮的生物地球化学循环主要由微生物驱动, 除固氮作用、硝化作用、反硝化作用和氨化作用外, 近年还发现厌氧氨氧化是微生物参与氮循环的一个重要过程。同时, 随着宏基因组学等分子生物技术的快速发展和应用, 参与氮循环的新的微生物类群——氨氧化古菌也逐渐被发现。这两个重要的发现大大改变了过去人们对氮循环的认识, 就近年有关厌氧氨氧化细菌、氨氧化古菌和氨氧化细菌的生态学研究进展作一简要综述。

关键词: 氮循环; 氨氧化作用; 厌氧氨氧化作用; 中温泉古菌; 氨氧化细菌

文章编号: 1000-0933(2009)01-0406-10 中图分类号: Q142, Q938 文献标识码: A

Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle

HE Ji-Zheng, ZHANG Li-Mei*

State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(1): 0406 ~ 0415.

Abstract: The global nitrogen biogeochemical cycling processes are predominantly driven by bacteria including: N_2 fixation, nitrification, denitrification, ammonification, and a new process, anaerobic ammonia oxidation (Anammox), which is a more recently described bacterial contribution to the nitrogen cycle. With the development and application of metagenomics and other molecular approaches, new “players” in the nitrogen cycle-ammonia oxidizing archaea (AOA) have also been identified. Our understanding of nitrogen cycling processes and the microorganisms that mediate them has been greatly improved with these two major breakthroughs in recent years. This review summarized some major advances in the microbial ecology of anaerobic, archaeal, and bacterial ammonia oxidisers.

Key Words: nitrogen cycle; ammonia oxidation; anaerobic ammonia oxidation; crenarchaeota; ammonia-oxidizing bacteria

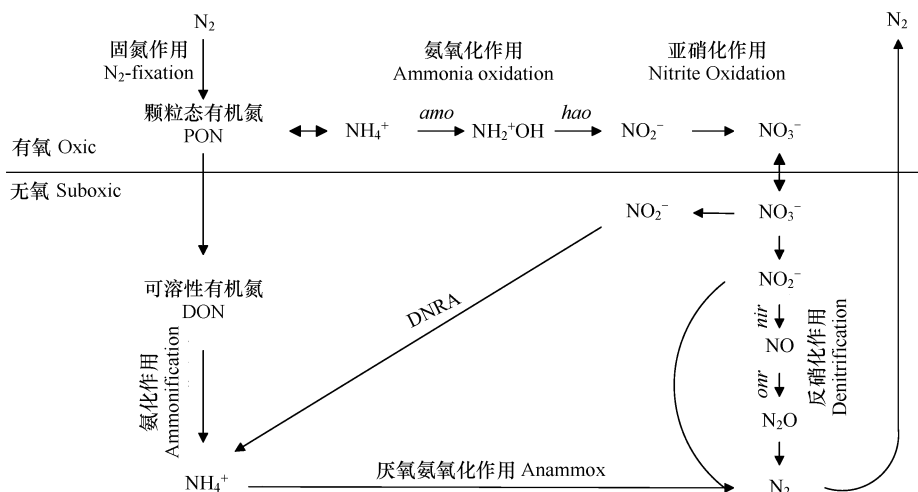
氮(N)是所有生物必需的营养元素。作为蛋白质的主要成份, 氮也是维持生物体结构组成和执行所有生物化学过程的基础。氮循环的 4 个主要过程, 即固氮作用、硝化作用、反硝化作用和氨化作用, 均由微生物所驱动(图 1)。

在这些过程中, 固氮作用由多种细菌参与, 它们利用固氮酶, 结合其它的酶和辅酶, 消耗能量, 打开氮气分子的三键, 生成氨^[2]。硝化作用($NH_3 \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$)的微生物代谢包括硝化作用(即氨氧化作用)和亚硝化作用两个过程, 分别由氨氧化细菌和亚硝酸盐氧化菌两类微生物催化进行。典型的氨氧化过程被认为是一个主要由变形菌纲中的一小部分细菌类群所进行的专性好氧的化能自养过程^[3]。相比之下, 反硝化作用或由厌氧微生物在无氧条件下通过无氧呼吸完成, 称之为“完全的”或“标准的”反硝化作用^[4, 5]; 或在有氧条件下, 微生物通过将 NO_2^- 还原转化成 NO , 称之为“不完全的”或“非典型的”反硝化作用^[6]。包括细菌、古菌甚

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40601049, 40701087, 50621804); 中国科学院知识创新工程重要方向性资助项目(KZCX2-YW-408, KZCX1-YW-0603)

收稿日期: 2008-04-03; 修订日期: 2008-10-14

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhanglm@rcees.ac.cn

图1 微生物参与的氮循环过程^[1]Fig. 1 Schematic processes of global nitrogen cycle driven by micro-organisms^[1]

amo 代表氨单加氧酶; *hao* 代表细菌羟胺氧化还原酶; *nir* 代表亚硝酸盐还原酶; *nor* 代表氧化氮还原酶 *amo*, ammonia mono-oxygenase; *hao*, bacterial hydroxylamine oxidoreductase; *nir*, nitrite reductase; *nor*, nitric oxide reductase

至真核生物(如海底栖居的有孔虫^[7])在内的 50 多个属的生物能进行反硝化作用。有机质降解时氮的释放和氨化作用(硝酸盐和亚硝酸盐通过同化和呼吸作用还原成氨)也是细菌、真菌和植物参与氮循环的不同途径。除这些生物过程外,还有一些非生物过程包括海底热液口中 N₂ 生成氨、燃烧时 N₂ 氧化成 NO₃⁻ 和 NO₂⁻、矿化作用等参与氮循环^[8]。

自 100 多年前细菌氨氧化作用首次被发现以来^[9],人们对氮循环的微生物过程已有不少认识,尤其是近几年来,快速经历了两次革命性的突破。第 1 次是自然界中细菌厌氧氨氧化作用(anaerobic ammonium oxidation, anammox)的发现,第 2 次是最近氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)的发现。这两个重要的发现再次激发了人们对微生物氮循环研究的兴趣。本文将对近年来厌氧氨氧化、氨氧化古菌和氨氧化细菌微生物生态学的研究进展作一综述。

1 厌氧氨氧化作用(Anammox)及其生态学意义

早在 1977 年, Brosa 等人根据氨氧化反应的化学热力学计算预测自然界中可能存在一个以 NO₂⁻ 为电子受体的氨氧化过程,且可能是一个生物过程^[10]。1989 年, Mulder 在荷兰 Gist Brocades 公司的反硝化试验工厂中发现氨态氮和硝态氮同时消失,并伴随着氮气明显增加的现象,他将这个潜在的过程称之为厌氧氨氧化作用(anammox)并申报了专利^[11]。随后,通过¹⁵N 标记、富集培养等一系列实验,他们最终证实这个过程是由浮霉状菌目(Planctomycetales)细菌所驱动的一个生物过程,细菌以亚硝酸盐作为电子受体将氨氧化成 N₂,即 $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- = \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ ^[12, 13]。

厌氧氨氧化细菌的发现在废水生物脱氮工程系统中迅速受到广泛关注,并逐渐实现了 Anammox 的工程应用,但一般认为其在自然生态系统氮循环中的作用甚微。然而,2002 年 Thamdrup 和 Dalsgaard^[14]应用¹⁵N 标记的硝酸盐和氨对海底沉积物进行的培养实验发现,厌氧氨氧化作用产生 N₂ 导致的氮损失占全部氮损失的 24% ~ 67%。2003 年,两个不同的研究小组^[15, 16]几乎同时在 Nature 杂志上分别报道了厌氧氨氧化是海洋氮损失的主要原因,在黑海和 Golfo Dulce 海的低氧水柱区通过厌氧氨氧化作用损失的氮达到 20% ~ 40%。近来更多的研究显示,通过 Anammox 损失的氮甚至更多^[17, 18]。目前在海洋、海岸和江河口的沉积物,厌氧海洋盆地,西非、智利和秘鲁等氧极小区(oxygen minimum zones, OMZs),红树林,海洋冰块和淡水湖等中都发现有厌氧氨氧化细菌^[14, 16, 17, 19, 20]。

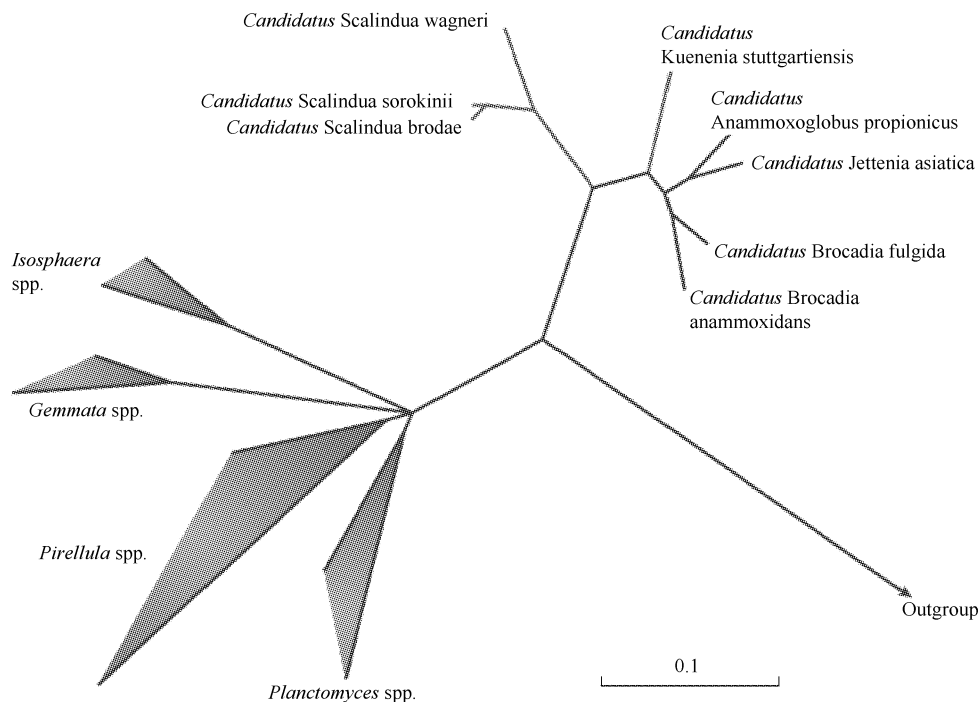
除了分布广泛,厌氧氨氧化细菌具有许多独特的特征:如以胍类物质(如 N₂H₄)为催化中间体;细胞内含

有膜结合小体即“氨氧化小体 (anammoxosome)”,小体中含有大量的羟胺氧化还原酶 (hydroxylamine oxidoreductase, HAO) 以催化羟胺的氧化与还原并进行电子传递^[21];合成梯烷 (ladderane) 脂类物质以减少胛对氨氧化小体质膜的毒性^[22]。目前已知的 4 个属的厌氧氨氧化细菌 *Candidatus* “Brocadia”, “Kuenenia”, “Scalindula”, “Anammoxoglobus”, 全都具有这些独特的生理和形态特征。

厌氧氨氧化细菌生长非常缓慢(倍增时间约为 2 周),至今仍未获得纯培养菌株。2001 年,Strous 等对富集培养物进行密度梯度离心分离获得的厌氧氨氧化菌 *Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis 开始进行全基因组测序分析,并于 2006 年公布了其全基因组草图^[23]。全基因组分析的结果显示 *Candidatus* K. stuttgartiensis 还具有更多独特的生理和生化特征,如基因组分析显示该菌通过乙酰辅酶 A 途径固定 CO₂,这一推测已通过碳的稳定性同位素标记实验得以证实,在这个过程中,1 个 CO₂ 分子被还原成甲基团,另一分子被还原成 CO 基团,甲基团和 CO 基团结合产生乙酰辅酶 A,并被还原成丙酮酸盐,胛氧化产生的高能量及较低的还原势为这一途径提供了条件^[24];分析还显示 *Candidatus* K. stuttgartiensis 的基因组中含有大量与地杆菌 (*Geobacter*) 和希瓦氏菌 (*Shewanella*) 中编码 c-型细胞色素的相似基因,表明其具有以铁离子和锰氧化物为呼吸底物的能力,这一能力也已通过实验得到证实^[23];此外,生理生化分析和基因组分析的结果都显示自养的厌氧氨氧化细菌能氧化甲酸盐、醋酸盐和丙酸盐为 CO₂,应用¹⁴C 标记的研究显示这些有机化合物仅被异化而不被同化^[25]。

全基因组分析的结果也进一步明确了 *Candidatus* K. stuttgartiensis 在浮霉状菌纲中的分类地位,如图 2 显示了 *Candidatus* K. stuttgartiensis 及其它 Anammox 细菌的分类位置^[26]。尽管不同 Anammox 细菌的进化距离较远,但它们在生理、代谢、超微结构特征上并没有表现出明显的不同,而分布却随生境及生态位不同而表现出明显的差异:如 *Candidatus* Scalindua 科主要发现于海洋环境,如黑海、纳米比亚海岸、智利、秘鲁和坦噶尼喀湖^[16~20];Brocadia 和 Kuenenia 主要发现于废水处理工厂和大规模的厌氧反应器的富集培养物中;而最近发现的新成员 *Candidatus* Anammoxoglobus propionicus 则是发现于包含氨、亚硝酸盐和丙酸盐矿物质培养基的分批补料培养物中^[27]。对 *Candidatus* A. propionicus 和 *Candidatus* B. anammoxidans 进行的竞争培养实验显示, *Candidatus* A. propionicus 对丙酸盐的强代谢能力使得其表现出明显的竞争优势,表明其分布依赖于丙酸盐生境的存在^[27]。总体说来,Anammox 细菌的生长要求生境中同时存在氨和亚硝酸盐,如在沉积物和水体的有氧-无氧界面能满足这样的生境,其中,有机物通过矿化作用或异养微生物的硝酸盐/亚硝酸盐的异化还原作用产生氨,亚硝酸盐则可能来自反硝化作用,也可能来自甲酸盐、乙酸盐和丙酸盐等有机物存在时 Anammox 细菌进行的硝酸盐还原作用,当氨向上扩散至有氧层时,氨氧化细菌和氨氧化泉古菌进行的氨氧化作用也能产生亚硝酸盐^[26]。此外,对 K. stuttgartiensis 的研究还发现其能进行硝酸盐异化还原成氨 (dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA),甚至在 NH₄⁺ 浓度达 10 mmol/L 的条件下还能将 NO₃⁻ 还原为 NH₄⁺^[28]。DNRA 能够为厌氧氨氧化提供 NH₄⁺,使 NH₄⁺ 最终转变为 N₂ 而损失,因此不论 DNRA 是由厌氧氨氧化菌还是由其它(兼性)厌氧微生物所进行,整个过程可被反硝化作用有效地屏蔽。

就全球范围来说,厌氧氨氧化作用对全球氮循环的贡献还不清楚。但结合¹⁵N 示踪技术,对生物标志物 ladderane 脂质的分析、FISH 分析及 16S rRNA 基因的聚类分析和定量分析,结果一致证实了厌氧氨氧化细菌在自然界广泛分布并在氮循环中起着重要的作用^[29]。几乎所有应用¹⁵N 标记的实验均显示厌氧氨氧化是以上区域中 N₂ 产生的主要原因,这部分氮占海洋氮损失量的 30% ~ 50%,而非硝酸盐通过异养反硝化微生物转化成 N₂ 所致^[17, 18, 20]。近来应用新设计的引物进行 PCR 分析,在多个淡水及海洋沉积物甚至永久冻土中均发现类似 Scalindula 的 16S rRNA 基因存在^[30]。尽管土壤中 Anammox 的活性还有待检测,但 Francis 等认为,就从一系列水生环境中均发现有厌氧氨氧化作用来看,这一过程可能广泛存在于几乎任何含氮低氧的生态系统中^[1]。同时,目前能用于 Anammox 细菌研究的只有 16S rRNA 基因。但最近已从 K. stuttgartiensis 中纯化得到一个具有将亚硝酸盐还原为氨的高活性的钙依赖性细胞色素 c 蛋白酶,且该酶的候选基因也基本确定^[23],不过仍没有建立可行的用于分析环境中厌氧氨氧化菌的功能标记基因。此外,与 Anammox-胛代谢相关的功能基因如胛水解酶和胛脱氢酶基因在 K. stuttgartiensis 基因组上的候选基因已被鉴定,近来在一个类似的微

图2 基于16S rRNA基因的厌氧氨氧化细菌的系统发育树^[26]Fig. 2 16S rRNA-gene-based phylogenetic tree of anammox bacteria^[26]

生物中还分离到一个肼氧化酶(hydrazine-oxidizing enzyme, HZO)及其基因^[31]。一旦这些功能基因与厌氧氨氧化作用的关系被确定,分析环境中 Anammox 细菌功能基因的丰度及其表达活性将成为可能,也将大大促进对土壤中 Anammox 细菌的研究。

2 中温泉古菌(Crenarchaeota)与氨氧化作用

随着厌氧氨氧化在氮循环中的重要作用逐渐被人们所认识,参与氮循环的新的微生物也逐渐被发现。过去一直认为古菌只存在于极端条件下,例如高温、高盐、极端酸性和厌氧等环境。近年来应用分子生物学技术的研究发现,中温泉古菌广泛分布于包括海洋、湖泊和土壤等在内的多种环境中,是地球上分布最广泛的一类微生物。基于16S rRNA基因的系统发育分析显示,这些中温泉古菌在环境中不仅含量丰富,且按生态来源的不同聚类于不同的分枝(图3),如海洋来源的序列聚类于 Group 1.1a,仅这一分枝就占海洋全部浮游原核生物的20%,也是深海海域的优势生物^[32, 33];土壤来源的序列多聚类于 Group 1.1b,这一分枝约占全部原核生物的1%~5%^[33, 34]。

早年通过同位素示踪技术的研究发现,¹⁴C-衰减性无机碳和 H₂¹³CO₃都能嵌合到生长旺盛的泉古菌细胞上,结合对古代泉古菌的类脂特征分析均表明这些中温海洋泉古菌营自养型生长^[36-38]。运用单细胞水平上的放射性自显影技术与染色技术相结合的方法也证实了泉古菌对无机碳的结合作用^[32]。但这些研究不能确定泉古菌自养生长的能量来源。直到最近,Venter等^[39]用鸟枪法对 Sargasso 海中的宏基因组进行测序分析后发现,文库中存在新的泉古菌氨单加氧酶基因(amoA)序列;Treusch等^[40]在一个43 kb的土壤宏基因组片段中也发现泉古菌的 amoA 基因。这两个研究首次揭示了未培养的中温泉古菌中氨氧化基因的存在。Könneke等^[41]成功地从海水中分离到一株泉古菌 *Nitrosopumilus maritimus*,该菌具有氨单加氧酶基因的所有成员 amoA, amoB 和 amoC,且以氨为唯一能源进行自养生长。这一发现有力地证实了泉古菌 amoA 基因与氨氧化作用之间的关系。

此后,越来越多的分子证据显示,在全球氮循环中起关键作用的海洋区域(包括透光层、低氧区水柱和海岸/入海口基部)中,这类中温泉古菌有着广泛的分布并可能具有氨氧化能力^[42],因此将这类微生物称作氨氧

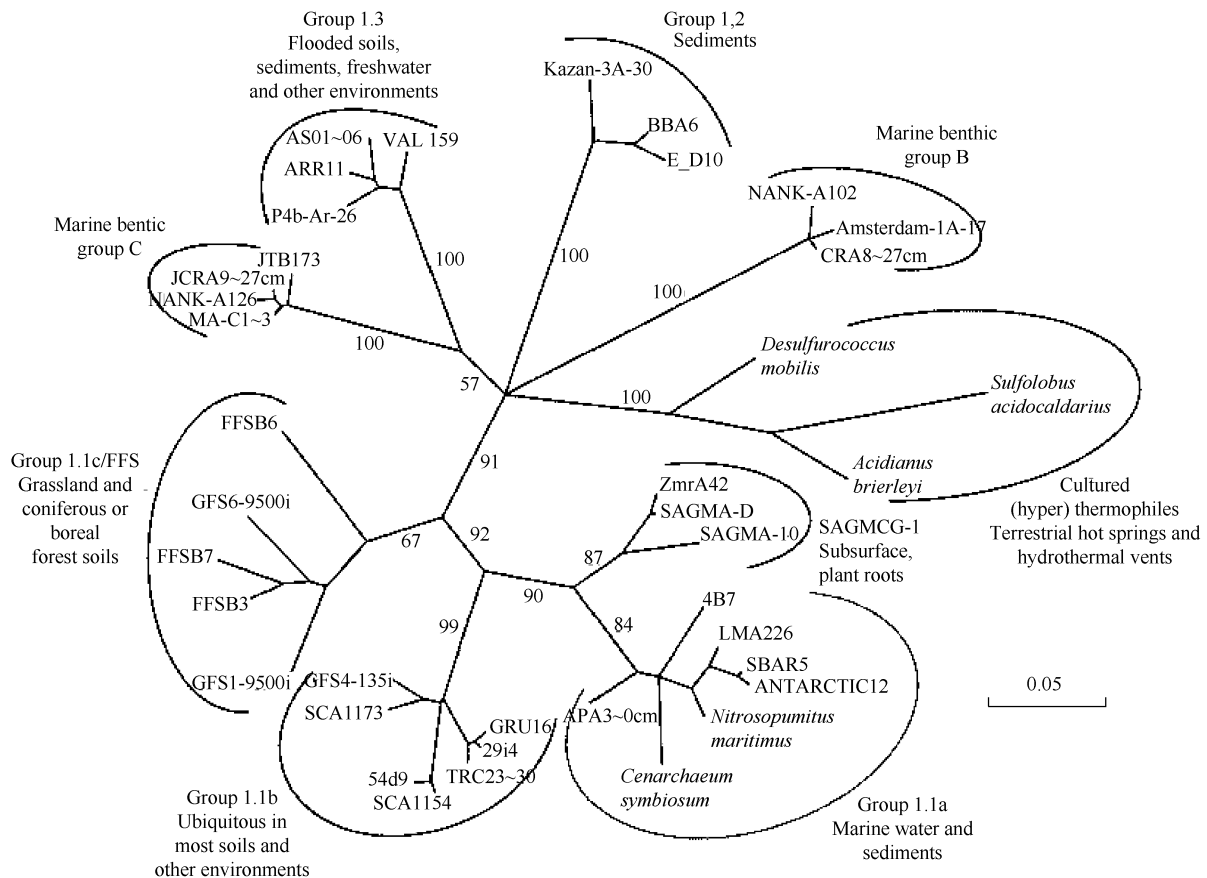


图3 非嗜热泉古菌和已培养的极端嗜热泉古菌主要类群的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree describing major non-thermophilic and cultivated (hyper) thermophilic lineages within the kingdom Crenarchaeota^[35]

化古菌 (ammonia-oxidizing archaea, AOA)。最近, Hallam 等^[43, 44]对泉古菌 group 1. 1a 中的 *Cenarchaeum symbiosum* 与海绵共生体的宏基因组进行分析, 发现其中存在几乎所有与化能自养氨氧化过程有关的关键基因簇, 包括氨单加氧酶基因 (*amoA*, *amoB* 和 *amoC*)、氨透性酶、尿酶、尿素运输系统、亚硝酸盐还原酶和 NO 还原酶辅助蛋白基因, 进一步证实泉古菌可利用还原性氮化合物作为自身能源; 但没有发现细菌催化氨氧化过程中第二步酶促反应的关键成分—羟胺氧化还原酶和细胞色素 *c*₅₅₄ 及 *c*₅₅₂ 的同系物, 暗示 *C. symbiosum* 的氨氧化途径可能与已知的氨氧化细菌不同^[44]。

3 氨氧化微生物 (细菌和古菌) 的生态学意义

氨氧化作用是硝化作用的第一个反应步骤, 也是限速步骤, 是全球氮循环的中心环节^[45, 46]。变形菌纲的氨氧化细菌将氨转化为硝酸盐作为唯一的能源而进行氨氧化作用, 并广泛分布于几乎所有土壤、淡水和海洋环境。此外, 所有的氨氧化细菌都含有编码催化氨氧化第一步反应的氨单加氧酶基因 *amoA*, *amoA* 基因在氨氧化菌中普遍存在且可作为氨氧化菌特异的分子标记。鉴于这些特点, 氨氧化细菌作为理想的微生物生态学研究的模式微生物受到广泛的关注^[3]。如对氨氧化细菌群落结构组成研究的结果显示, 土壤环境因子的变化如氨的可利用性、有机质含量、pH、土壤类型、植被和污染物对不同的氨氧化菌类群有特异的选择性^[3, 47, 48]。基于实时荧光 PCR 的定量研究结果显示施肥土壤中氨氧化细菌的数量是非施肥土壤中的 3 倍之多^[49], 且随加入的铵浓度的增加而增加^[50]。Horz 等^[51]在 jasper ridge global change experiment (JRGCE) 的研究中也发现氨氧化细菌的群落结构和丰度对模拟的全球变化如温度、CO₂ 浓度、降水量和氮肥等的变化有明显的响应。郝永俊等^[52]对更多涉及环境因子 (包括铵、酸度、pH、氧气、温度和盐度) 对这类好氧氨氧化细菌群落结构和数量的影响的研究作了详细综述报道。总的说来, 许多研究结果均表明氨氧化细菌对陆地生态系

统中环境因子的变化具有潜在的指示作用。

随着越来越多的证据显示在自然界原核生物组成中占重要比例的中温泉古菌具有氨氧化能力,这群独特的微生物迅速吸引了人们的眼光,成为一个新的研究热点。2006 年, Wuchter 等^[53] 在美国科学院院刊 (PNAS) 上报了他们在北海及北大西洋的研究结果, 显示在这些海域中, 古菌 *amoA* 基因的拷贝数是 β -变形菌纲细菌的 10 ~ 1000 倍, 且与泉古菌的细胞数量呈明显的正相关关系。同年, Leininger 等^[54] 在 *Nature* 杂志上发表了他们对 12 个跨越 3 个气候带的原始土壤和农业土壤中的研究结果, 发现在这些来源广泛的土壤样品中, 泉古菌 *amoA* 基因的拷贝数可高达 β -变形菌纲细菌的 3000 倍, *amoA* 基因的拷贝数与泉古菌特有的脂质 (包括 crenarchaeol) 含量呈正相关。同时, 应用反转录定量 PCR 和焦磷酸测序技术对 cDNA 的测序分析都证实了 *amoA* 基因的原位表达活性与 *amoA* 基因数量研究结果一致, 均高于 AOB。总体来说, 这些发现都证明多数中温泉古菌都属于 AOA, 其在海洋和土壤中的数量在所有氨氧化微生物中占据优势。

对上百个古菌 *amoA* 基因序列进行的聚类分析结果显示, AOA 种类的分布与不同的生境和取样位点有关, 如在水柱区和沉积物区很少有重叠的序列^[55]。在墨西哥 Bahía del Tóbari 的海口沉积物中, 海口内部区域与入海口附近的 AOA 的群落结构组成有较大差异, 其分别属于分布较广的泉古菌 group 1.1a 和 1.1b 中^[56]。最近在硝化废水处理的反应器中也检测到 AOA 的存在, 但来自美国 4 个不同州的活性污泥的 75 个古菌 *amoA* 基因序列中有 50 个序列几乎是相同的^[57]。此外, 从奥地利一放射性热泉中获得的古菌 *amoA* 基因序列和美国科罗拉多州的一个地热矿坑获得的序列具有很高的相似性, 表明 AOA 在亚表层/洞穴生态系统中起着重要作用, 也暗示泉古菌在较高的环境温度下 (如 45 ~ 50℃) 也可能进行氨氧化作用^[58]。尽管这些亚表层环境并非真正的“嗜高温环境”, 但在高至 86℃ 和 97℃ 的陆地热泉中也检测到古菌 *amoA* 基因^[58~60]。最近有报道在 53.5 ~ 63.4℃ 的热泉中发现蓝细菌垫 (cyanobacterial mats) 的固氮作用^[61] 和 92℃ 深海热流口发现产甲烷菌^[62], 暗示在这些高温环境中氮循环非常活跃, 但还不能确定这些 *amoA* 基因是否代表一些嗜热泉古菌, 还是嗜中温泉古菌的耐热性和其所能栖居的生态位之广超出人们目前的认识, 两种推测皆可能存在。最近在北太平洋海岸及开放海域中还发现古菌中进化距离较远的一个热泉菌分枝 pSL12 中也含有与泉古菌 *amoA* 的类似基因^[63], 表明自然界还有新的具有氨氧化能力的微生物存在。

在典型的微生物群落中, AOB 所占的比例 < 0.1%^[64], 且氨氧化细菌主要集中在几个属: 亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*), 亚硝化螺菌属 (*Nitrospira*) 和亚硝化球菌属 (*Nitrosococcus*)^[65]。相比之下, AOA 不论是在数量、多样性及其栖居范围各方面都胜于 AOB。随着研究的深入, 对环境中 AOA 的认识更加清楚, 研究结果更引人注目。如 Treusch 等^[40] 对土壤微宇宙中 *amoA* 基因表达的定量分析显示, AOA 在自然土壤样品中具有活性, 而在铵浓度提高的情况下 *amoA* 基因表达明显增加。Urakawa 等^[66] 报道在水簇馆的生物过滤膜系统中, AOA 的多样性和物种丰度高于 AOB, 且 AOA 和 AOB 群落结构和多样性主要受温度影响。

近来中国科学院生态环境研究中心贺纪正等对农田土壤生态系统中 AOA 和 AOB 的丰度、组成及对环境的影响进行了一系列研究, 取得重要进展^[67~69]。对我国长期农业定位试验站湖南祁阳旱地肥力及肥料效应变化长期定位试验点红壤 (pH 3.7 ~ 5.8) 的研究结果显示, 长期施肥处理对土壤中总细菌数量影响不大, 但对 AOB 和 AOA 的种群数量有显著影响。AOB 和 AOA 的数量在氮磷钾肥和有机质混施 (NPK + OM) 的处理中最高, 而在只施氮肥的处理 (N) 中最低; 在各处理中, AOA 的数量明显高于 AOB, 且 AOB 和 AOA 的数量、土壤 pH 和硝化潜势之间存在明显的正相关关系, 表明 AOB 和 AOA 在土壤氨氧化作用中起着重要的作用; AOB 的群落结构组成在各处理之间没有显著差异, 均属于亚硝化螺菌 (*Nitrospira*) 中的 cluster 3, 而 AOA 的序列与土壤来源 (cluster S) 和海洋及沉积物来源 (cluster M) 的未培养的氨氧化古菌聚类在一起, 且与海洋及沉积物来源的序列相似性较高的序列仅在偏施氮肥及磷钾的处理 (N、NP、NK、PK) 中出现, 表明长期施肥处理对氨氧化古菌的群落结构组成产生明显的影响^[67], 在国际上首次揭示了 AOA 的群落结构组成对长期施肥处理及其引起的土壤性质变化的响应比 AOB 更明显。而对河南封丘长期定位试验点碱性潮土 (pH 8.3 ~ 8.7) 的研究结果表明, AOB 的数量在施氮肥的处理中最高, AOA 的数量在所有处理中显著高于 AOB, 但在各施肥处

理之间无显著差异; DGGE 分析显示不同施肥处理引起 AOB 群落结构的变化, 而对 AOA 的结构组成没有明显影响; AOB 中主要以亚硝化螺菌属类似 (*Nitrosospira*-like) 的序列占优势, 仅少部分序列属于亚硝化单胞菌 (*Nitrosomonas*); 所有 AOA 序列与土壤来源和海洋及沉积物来源的序列具有很高的相似性, 但在各施肥处理间没有显著差异, 表明碱性土壤中长期施肥处理对 AOB 的数量及组成有明显影响而对 AOA 的影响较小^[69]。在水稻土中, 根际 AOA 数量是 AOB 的 60 多倍, AOA 的数量在根际明显高于非根际; 在种植水稻的土壤中 AOA 和 AOB 的数量明显高于不种植水稻的土壤, 且 AOA 和 AOB 的组成在两种土壤中也有所不同, 表明 AOA 也是水稻土根际的优势氨氧化微生物, 且 AOA 可能比 AOB 更易受水稻土中氧含量的影响^[68]。图 4 显示了 AOA 和 AOB 在不同土壤中的数量变化。以上研究是国内也是国际上首次针对我国典型的红壤、潮土和水稻土中氨氧化古菌和氨氧化细菌所进行的系统研究, 促进了对陆地生态系统中氮循环微生物学过程的认识。

此外, 基于 *amoA* 基因 mRNA 水平的分析为研究 AOA 在环境中的活性及其对氨氧化作用的贡献提供了更直接的证据, 如 Tournier 等^[70] 进行的土壤微宇宙实验结果显示, 随培养温度及培养时间的延长, 土壤硝化作用增强, 而在不同培养温度下 (10 ~ 30℃), AOA 的 16S rRNA 和 *amoA* 基因拷贝数比 AOB 高一个数量级, mRNA 的反转录活性则高 27 倍, AOA 与 AOB *amoA* 基因的拷贝数之比随温度升高而增加。此外, 与海洋和亚表层来源的序列最相近的 AOA 序列减少, 导致 AOA 的群落结构产生明显变化, 这种变化在较高的培养温度下更明显。从以上研究结果可以看出, 各种环境因子包括: 铵浓度、温度、施肥处理、土壤类型、重金属胁迫、氧气等的变化都直接影响着环境中 AOA 和 AOB 的种群数量、群落结构及其活性, 从而影响着硝化作用乃至氮的生物地球化学循环。换言之, AOA 和 AOB 能对各种

环境条件的变化产生不同的响应, 可作为潜在的环境条件变化的重要指标, 对其生态特征的充分认识将为环境质量变化提供预测、预警并为生态系统中氮元素循环的有效管理提供重要依据。

4 结语

对自然界中厌氧氨氧化作用及氨氧化古菌的发现是通过两个不同的途径获得的, 基于生物地球化学的研究导致了厌氧氨氧化过程及厌氧氨氧化细菌的发现, 而泉古菌在硝化过程中的潜在作用则是通过宏基因组学和培养技术的研究得以发现, 分子生物学技术在确定氨氧化微生物的分布和丰度方面发挥了重要的作用。有关氮循环的新的突破将依赖于综合考虑所有这些相关途径和其中参与转化的所有微生物。包括分子生物学方法、宏基因组学、培养及生物地球化学等多种方法的结合应用将在氮的微生物循环过程研究中继续发挥重要作用。尽管有关氮的微生物循环过程已取得重要进展, 但还存在许多问题有待探讨: 如许多数据表明厌氧氨氧化作用在一系列水生环境中广泛存在, 但其在土壤中的活性还有待检测; 尽管在许多环境中 AOA 的数量比 AOB 高, 但有没有相反的情况存在? 其数量是否与其真正的活性有关? 这些微生物是否真正起着同样重要的功能? 是否 AOA, AOB 和 Anammox 细菌及它们各自的生态类型能对更多的环境扰动和环境条件 (如 N、O、光和盐) 梯度作出不同的响应; 许多数据暗示海洋和陆地的泉古菌是氮的生物地球化学循环的主要驱动者, 那么氮循环和碳循环如何耦联? 如假设 OMZs 区的氮损失主要由自养的厌氧氨氧化而不是由异养反硝化作用所驱动, 那么其中有机碳不经反硝化作用矿化又会如何呢? 同时, 就古菌来说, 它们异常高的数量意味着即使其所进行的化能自养氨氧化速率非常低, 其也代表着深海中一个巨大的碳源库, 其对碳循环的贡献又如

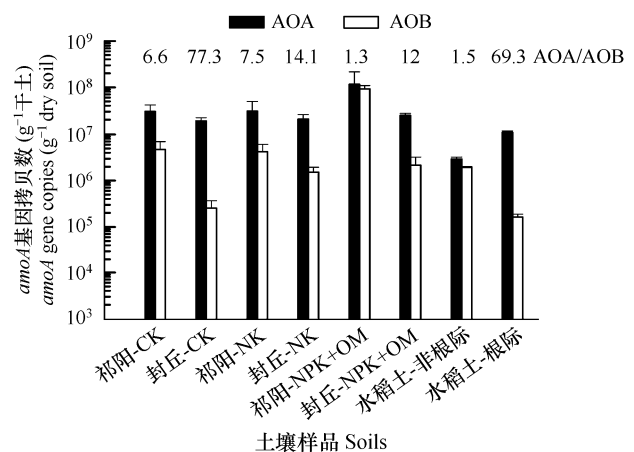


图 4 不同土壤样品中 AOA 和 AOB *amoA* 基因的数量

Fig. 4 Abundance of AOA and AOB in different soils with different fertilization treatments

何? 对这些问题的认识才刚开始,但可以肯定,Anammox 细菌、AOB 和 AOA 的生态学将是未来几年研究的热点领域,对我们进一步理解全球氮、碳循环和全球气候变化等重大问题至关重要。

References:

- [1] Francis C A, Beman J M, Kuypers M M M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal*, 2007, 1:19—27.
- [2] Postgate J R. Biological nitrogen fixation. *Nature*, 1970, 226:25—27.
- [3] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 485—529.
- [4] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61:533—616.
- [5] Brandes J A, Devol A H, Deutsch C. New developments in the marine nitrogen cycle. *Chemical Reviews*, 2007, 107:577—589.
- [6] Lipschultz F, Zafiriou O C, Wofsy S C, *et al.* Production of NO and N₂O by soil nitrifying bacteria. *Nature*, 1981, 294:641—643.
- [7] Risgaard-Petersen N, Langezaal A M, Ingvaldsen S, *et al.* Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature*, 2006, 443:93—96.
- [8] Klotz M G, Stein L Y. Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 278:146—156.
- [9] Winogradsky S. 2nd memoire. Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann. Inst. Pasteur.*, 1890, 4:257—275.
- [10] Broda E. Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 1977, 17:491—493.
- [11] Mulder A. Anoxic ammonia oxidation. US Patent, 1992, 5,078,884.
- [12] Mulder A, Vandegraaf A A, Robertson L A, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 16:177—183.
- [13] van de Graaf A A, Mulder A, de Bruijn P, *et al.* Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61:1246—1251.
- [14] Thamdrup B, Dalsgaard T. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68:1312—1318.
- [15] Dalsgaard T, Canfield D E, Petersen J, *et al.* N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature*, 2003, 422:606—608.
- [16] Kuypers M M M, Sliekers A O, Lavik G, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, 2003, 422:608—611.
- [17] Kuypers M M M, Lavik G, Woebken D, *et al.* Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102:6478—6483.
- [18] Hamersley M R, Lavik G, Woebken D, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnology and Oceanography*, 2007, 52:923—933.
- [19] Schubert C J, Durisch-Kaiser E, Wehrli B, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika). *Environmental Microbiology*, 2006, 8:1857—1863.
- [20] Thamdrup B, Dalsgaard T, Jensen M M, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation in the oxygen-deficient waters off northern Chile. *Limnology and Oceanography*, 2006, 51:2145—2156.
- [21] Schalk J, de Vries S, Kuenen J G, *et al.* Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in anaerobic ammonium oxidation. *Biochemistry*, 2000, 39:5405—5412.
- [22] Damste J S S, Strous M, Rijpstra W I C, *et al.* Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature*, 2002, 419: 708—712.
- [23] Strous M, Pelletier E, Mangenot S, *et al.* Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, 2006, 440:790—794.
- [24] Schouten S, Strous M, Kuypers M M M, *et al.* Stable carbon isotopic Fractionations associated with inorganic carbon fixation by anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70:3785—3788.
- [25] Guven D, Dapena A, Kartal B, *et al.* Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71:1066—1071.
- [26] Kuenen J G. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6:320—326.
- [27] Kartal B, Rattray J, van Niftrik L A, *et al.* Candidatus “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium

- oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, 30:39–49.
- [28] Kartal B, Kuypers M M M, Lavik G, *et al.* Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environmental Microbiology*, 2007, 9:635–642.
- [29] Schmid M C, Maas B, Dapena A, *et al.* Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71:1677–1684.
- [30] Penton C R, Devol A H, Tiedje J M. Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72:6829–6832.
- [31] Shimamura M, Nishiyama T, Shigetomo H, *et al.* Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73:1065–1072.
- [32] Herndl G J, Reinthaler T, Teira E, *et al.* Contribution of archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71:2303–2309.
- [33] Ochsenreiter T, Selezi D, Quaiser A, *et al.* Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology*, 2003, 5:787–797.
- [34] Sandaa R A, Enger OTorsvik V. Abundance and diversity of archaea in heavy-metal-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65:3293–3297.
- [35] Nicol G W, Schleper C. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends in Microbiology*, 2006, 14:207–212.
- [36] Kuypers M M M, Blokker P, Erbacher J, *et al.* Massive expansion of marine archaea during a mid-cretaceous oceanic anoxic event. *Science*, 2001, 293:92–94.
- [37] Pearson A, McNichol A P, Benitez-Nelson B C, *et al.* Origins of lipid biomarkers in Santa Monica Basin surface sediment: A case study using compound-specific Delta C14 analysis. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 2001, 65:3123–3137.
- [38] Wuchter C, Schouten S, Boschker H T S, *et al.* Bicarbonate uptake by marine Crenarchaeota. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 219:203–207.
- [39] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, 304:66–74.
- [40] Treusch A H, Leininger S, Kletzin A, *et al.* Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 2005, 7:1985–1995.
- [41] Konneke M, Bernhard A E, de la Torre J R, *et al.* Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437:543–546.
- [42] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102:14683–14688.
- [43] Hallam S J, Mincer T J, Schleper C, *et al.* Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *Plos Biology*, 2006, 4:520–536.
- [44] Hallam S J, Konstantinidis K T, Putnam N, *et al.* Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103:18296–18301.
- [45] Prosser J I. Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 1989, 30:125–181.
- [46] Deboer W, Gunnewiek P J A K, Veenhuis M, *et al.* Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57:3600–3604.
- [47] Jordan F L, Cantera J J L, Fenn M E, *et al.* Autotrophic ammonia-oxidizing bacteria contribute minimally to nitrification in a nitrogen-impacted forested ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71:197–206.
- [48] Yuan F, Ran W, Hu J, *et al.* Ammonia-oxidizing bacteria communities and their influence on the nitrification potential of Chinese soils measured by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(6):1318–1324.
- [49] Hermansson A, Lindgren P E. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67:972–976.
- [50] Okano Y, Hristova K R, Leutenegger C M, *et al.* Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70:1008–1016.
- [51] Horz H P, Barbrook A, Field C B, *et al.* Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101:15136–15141.
- [52] Hao Y J, Wu S W, Wu W X, *et al.* Research progress on the microbial ecology of aerobic ammonia-oxidizing bacteria. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(4):1573–1582.
- [53] Wuchter C, Abbas B, Coolen M J L, *et al.* Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103:12317–12322.
- [54] Leininger S, Urich T, Schlöter M, *et al.* Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442:806–809.

- [55] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102:14683 — 14688.
- [56] Beman J M, Francis C A. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahia del Tobari, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72:7767 — 7777.
- [57] Park H D, Wells G F, Bae H, *et al.* Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72:5643 — 5647.
- [58] Weidler G W, Dommayr-Pfaffenhueimer M, Gerbl F W, *et al.* Communities of archaea and bacteria in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and evidence of ammonia-oxidizing Crenarchaeota. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73:259 — 270.
- [59] Reigstad L J, Richter A, Daims H, *et al.* Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64: 167 — 174.
- [60] Zhang C L, Pearson A, Li Y L, *et al.* Thermophilic temperature optimum for crenarchaeol synthesis and its implication for archaeal evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72:4419 — 4422.
- [61] Steunou A S, Bhaya D, Bateson M M, *et al.* *In situ* analysis of nitrogen fixation and metabolic switching in unicellular thermophilic cyanobacteria inhabiting hot spring microbial mats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103:2398 — 2403.
- [62] Mehta M P, Baross J A. Nitrogen fixation at 92 degrees C by a hydrothermal vent archaeon. *Science*, 2006, 314:1783 — 1786.
- [63] Mincer T J, Church M J, Taylor L T, *et al.* Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environmental Microbiology*, 2007, 9:1162 — 1175.
- [64] Ward B B, Martino D P, Diaz M C, *et al.* Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline Mono Lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66:2873 — 2881.
- [65] Purkhold U, Pommerening-Roser A, Juretschko S, *et al.* Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66:5368 — 5382.
- [66] Urakawa H, Tajima Y, Numata Y, *et al.* Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74:894 — 900.
- [67] 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. *Environmental Microbiology*, 2007, 9:2364 — 2374.
- [68] Chen X P, Zhu Y G, Xia Y, *et al.* Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil? *Environmental Microbiology*, 2008, 10:1978 — 1987.
- [69] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, *et al.* Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environmental Microbiology*, 2008, 10:1601 — 1611.
- [70] Tournu M, Freitag T E, Nicol G W, *et al.* Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology*, 2008, 10:1357 — 1364.

参考文献:

- [48] 袁飞, 冉炜, 胡江, 等. 变性梯度凝胶电泳法研究我国不同土壤氨氧化细菌群落组成及活性. *生态学报*, 2005, 25(6):1318 ~ 1324.
- [52] 郝永俊, 吴松维, 吴伟祥, 等. 好氧氨氧化菌的种群生态学研究进展. *生态学报*, 2007, 27(4):1573 ~ 1582.