

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2023.02.013

张馥, 胡若宁, 高萍, 等. 青藏高原三种典型生境中硝化微生物分布和群落结构. 土壤, 2023, 55(2): 331–339.

青藏高原三种典型生境中硝化微生物分布和群落结构^①

张馥¹, 胡若宁¹, 高萍¹, 匡璐¹, 夏磊¹, 周星怡¹, 朱家宸¹, 柳旭², 时玉³, 褚海燕², 王保战^{1*}, 蒋建东¹

(1 南京农业大学生命科学学院, 农业农村部农业环境微生物重点实验室, 南京 210095; 2 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008; 3 河南大学生命科学学院, 河南开封 475004)

摘要: 以青藏高原3种典型生境(荒漠草地、湿地和盐碱地)为研究对象, 通过 *amoA* 功能基因 qPCR 和 16S rRNA 基因扩增子测序, 研究了其氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)、氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)、亚硝酸盐氧化菌(nitrite-oxidizing bacteria, NOB)和完全硝化细菌(complete ammonia oxidizer, CMX)的分布与群落结构特征。qPCR 结果表明, 荒漠草地和盐碱地中3种氨氧化微生物, 其丰度顺序为 AOA>CMX>AOB, 而在湿地中则为 CMX \geq AOA>AOB。各生境中 AOA 主要类群为土壤类群(即 group 1.1b), 且其中约半数属于 *Nitrosocosmicus* 属分支, 该分支在北极冻土中也有分布。荒漠草地和湿地中 AOB 主要为亚硝化螺菌属(*Nitrosospira* spp., 71.21%~100%), 而盐碱地主要为亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas* spp., 75.51%~88.71%)。3种生境中 NOB 主要类群均为硝化螺菌属(*Nitrosospira* spp., 70.87%~98.79%)。clade A 和 clade B 分支的 CMX 在各生境均存在, 且二者比例相当。值得注意的是, 大多生境中都检测出一种或多种典型海洋类群硝化微生物, 比如 group 1.1a 的 AOA、*N. marina* 的 AOB、Lineage 4 的 NOB, 这强烈暗示青藏高原硝化微生物可能受青藏高原古海洋环境的影响。

关键词: 青藏高原; 氨氧化古菌; 氨氧化细菌; 亚硝酸盐氧化微生物; 完全硝化微生物

中图分类号: S154.3 文献标志码: A

Distribution and Community Structures of Nitrifying Microorganisms in Three Typical Habitats of Qinghai-Tibet Plateau

ZHANG Fu¹, HU Ruoning¹, GAO Ping¹, KUANG Lu¹, XIA Lei¹, ZHOU Xingyi¹, ZHU Jiachen¹, LIU Xu², SHI Yu³, CHU Haiyan², WANG Baozhan^{1*}, JIANG Jiandong¹

(1 College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Agricultural and Environmental Microbiology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210095, China; 2 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 3 College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China)

Abstract: The absolute abundance of *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea (AOA), ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and complete ammonia oxidizer (CMX) in three typical habitats of Qinghai-Tibet Plateau were determined by the qPCR, and the community structures of AOA, AOB and nitrite-oxidizing bacteria (NOB) were analyzed by using the Illumina HiSeq sequencing of the 16S rRNA gene amplicons. The qPCR demonstrates that the abundance of *amoA* genes of ammonia oxidizers is in the order AOA>CMX>AOB in the desert grassland and alkaline saline soils, but CMX \geq AOA>AOB in the wetlands. The 16S rRNA gene amplicon analysis reveals that the AOA mostly are belonged to the *Nitrosocosmicus* clade of the soil group 1.1b in nearly all three habitats, which is also detected in the Arctic soils. *Nitrosospira* is the predominant genus in the desert grassland and wetland with 71.21%–100% of all AOB sequences, but 75.51%–88.71% of AOB in alkaline saline soils fall into the genus of *Nitrosomonas*. However, NOB of all three habitats are mostly affiliated with the genus of *Nitrosospira* with 70.87%–98.79% of all NOB sequences. Both clade A and B of CMX are detected in all three habitats and with the similar relative abundances. Notably, most habitats in this study harbor typical lineages of nitrifier specific from marine ecosystems, for instance, group 1.1a of AOA, *N. marina* of

①基金项目: 国家自然科学基金项目(41977056)资助。

* 通讯作者(bzwang@njau.edu.cn)

作者简介: 张馥(1997—), 女, 河南郑州人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: 2019116054@njau.edu.cn

AOB and lineage 4 of NOB, strongly indicating that these nitrifying communities are also influenced by the paleo-ocean environment since the Qinghai-Tibet Plateau was Tethys Sea 500 Ma year ago.

Key words: Qinghai-Tibet Plateau; Ammonia-oxidizing archaea; Ammonia-oxidizing bacteria; Nitrite-oxidizing bacteria; Comammox

青藏高原是全球面积最大、海拔最高的高原,平均海拔为 4 378 m,被称为地球的“第三极”。青藏高原生态系统多样性极高,拥有荒漠、草地、森林、湖泊湿地、河流湿地、盐碱地等,且其高寒气候条件和 5 000 万年前的古海洋生境可能孕育了特有的微生物群落及结构,驱动了青藏高原的物质能量循环,在全球气候变化中扮演了重要的角色。

微生物硝化过程是全球氮素循环的核心环节,是氮素循环中唯一的氧化途径,即将 NH_4^+ 氧化成 NO_2^- , 然后 NO_2^- 被进一步氧化成 NO_3^- [1]。前者主要由氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)或氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)驱动,在有氧条件下由氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, AMO)催化氨(NH_3)氧化为羟胺(NH_2OH),又在羟胺氧化还原酶(hydroxylamine oxidoreductase, HAO)的催化下迅速氧化为亚硝酸盐(NO_2^-),该过程被称为氨氧化过程,是硝化过程的限速步骤[2]。后者由亚硝酸盐氧化菌(nitrite-oxidizing bacteria, NOB)驱动,通过亚硝酸盐氧化还原酶(NXR)将亚硝酸盐氧化为硝酸盐。而完全硝化微生物(complete ammonia oxidizer, Comammox 或 CMX)的发现改变了上百年来硝化过程必须由两种微生物接力完成的经典研究范式[3-4]。然而这些硝化微生物在青藏高原典型生境中的分布规律和群落结构特征却并不清楚。

本文针对青藏高原荒漠草地、湿地(河流/湖泊)、盐碱地 3 种典型生境,通过 *amoA* 功能基因实时荧光定量 PCR(qPCR)、16S rRNA 基因扩增子 Illumina HiSeq 测序等技术手段,解析青藏高原 3 种典型生境的硝化微生物分布和群落结构特征,将有助于加深对青藏高原硝化过程微生物学机制的认识。

1 材料与方法

1.1 土样采集

供试 5 个土壤的采样地点位于 30°N 附近的青藏高原,分别为措勤、申扎、纳木错、雅鲁藏布江中游和扎布耶茶卡(图 1)。研究地区属高原山地气候,平均海拔 4 000 m 以上,年均气温 1.7 °C,年均降水 400 mm。本研究共采集了 10 个样本,将取自措勤和申扎的荒漠草地土壤样本命名为 C1、C2、C3、C4,

将取自纳木错和雅鲁藏布江中游的湿地土壤样本命名为 S5、S6、S7、S8,将取自扎布耶茶卡的盐碱地土壤样本命名为 Z9、Z10。

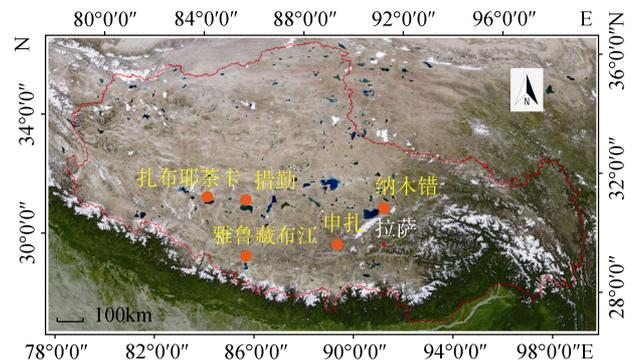


图 1 5 个土壤采样点地理位置示意图
Fig. 1 Locations of five soil sampling points

1.2 土壤理化性质测定

使用 pH 计(Thermo Orion-868, MA, USA)测定土壤 pH,水土质量比为 5 : 1;使用总有机碳分析仪(Multi N/C 3100, Analytik Jena AG, 德国)测定土壤可溶性有机碳(DOC)含量;使用连续流动分析仪(San ++ System, Skalar, Holland)测定土壤铵态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、硝态氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)和溶解性总氮(DTN)含量(表 1)。溶解性有机氮(DON)使用以下公式计算: $\text{DON} = \text{DTN} - (\text{NH}_4^+\text{-N} + \text{NO}_3^-\text{-N})$ 。将沉积物风干并将其筛分至 2 mm,通过燃烧法测定(Thermo Fisher Scientific Flash Smart Elemental Analyzer, Bremen, Germany)测定土壤全碳(TC)和全氮(TN)含量。ICP-AES Optima 8000 仪器(Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)用于测量全磷(TP)和全钾(TK)含量。

1.3 土壤 DNA 提取

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

1.4 *amoA* 基因定量 PCR

利用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(Thermo Fisher, 美国)对青藏高原土壤中 AOA、AOB 和 CMX

的 *amoA* 基因进行定量分析。反应体系为 20 μ L:10 μ L SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa, 日本), 0.8 μ L 上下游引物 (10 μ mol/L), 2 μ L (约 1~10 ng) 模板 DNA, 补充双蒸水至 20 μ L。qPCR 引物和反应条件见表 2。每

个样品设置 3 个重复, 每个重复包含 3 个测试平行。将含有 AOA、AOB 和 CMX *amoA* 基因的单克隆质粒 DNA 梯度稀释成 $10^1 \sim 10^9$ 的标准浓度作为 qPCR 标准曲线。

表 1 土壤的基本理化性质
Table 1 Physicochemical properties of tested soils

环境因子	荒漠草地				湿地				盐碱地	
	C1	C2	C3	C4	S5	S6	S7	S8	Z9	Z10
经度(°E)	85.74	85.74	85.74	91.00	91.00	91.00	85.46	85.46	84.04	84.04
纬度(°N)	31.04	31.04	31.04	30.93	30.93	30.93	29.32	29.32	31.40	31.40
pH	9.49	9.50	9.29	7.77	10.16	9.80	8.99	9.01	10.81	10.89
TC(g/kg)	6.10	3.56	5.44	4.18	7.79	6.85	19.90	25.60	11.98	26.15
TN(g/kg)	0.45	0.33	0.42	0.35	0.23	0.15	0.6	1.3	0.11	0.19
TK(mg/kg)	20.00	22.75	23.85	23.55	141.00	135.00	94.00	108.00	125.50	120.00
TP(mg/kg)	3.90	4.40	3.35	13.30	1.65	1.50	2.05	2.70	1.95	1.95
DOC(mg/kg)	10.60	9.95	10.50	10.30	16.60	13.80	12.00	7.70	17.00	14.80
DON(mg/kg)	3.90	4.65	3.80	3.80	5.10	4.70	4.35	5.35	1.30	0.60
NH ₄ ⁺ -N(mg/kg)	5.35	5.30	5.10	5.70	0.10	0.05	4.95	5.45	1.45	1.05
NO ₃ ⁻ -N(mg/kg)	1.75	2.45	1.90	1.80	5.65	5.60	1.75	2.60	2.20	2.15

表 2 定量 PCR 扩增引物及反应条件
Table 2 Quantitative PCR amplification primers and their reaction conditions

目标基因	引物名称	引物序列	片段长度	定量 PCR 反应程序	参考文献		
AOA <i>amoA</i>	Arch- <i>amoA</i> F	STAATGGTCTGGCTTAGACG	639 bp	95 °C 预变性 3 min, 38 个循环(95 °C 变性 10 s, AOA、AOB 和 CMX 的 <i>amoA</i> 基因的退火温度分别为 55 °C、55 °C 和 48 °C, 退火时间为 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 在 83 °C 下读板); 溶解曲线: 在 65~95 °C, 每增加 0.5 °C, 保持 5 s 读取荧光值	[5]		
	Arch- <i>amoA</i> R	GCGGCCATCCATCTGTATGT					
AOB <i>amoA</i>	<i>amoA</i> -1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	491 bp		95 °C 预变性 3 min, 38 个循环(95 °C 变性 10 s, AOA、AOB 和 CMX 的 <i>amoA</i> 基因的退火温度分别为 55 °C、55 °C 和 48 °C, 退火时间为 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 在 83 °C 下读板); 溶解曲线: 在 65~95 °C, 每增加 0.5 °C, 保持 5 s 读取荧光值	[6]	
	<i>amoA</i> -2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC					
CMX <i>amoA</i>	Ntsp- <i>amoA</i> -162F	GGATTCTGGNTSGATTGGA	198 bp			95 °C 预变性 3 min, 38 个循环(95 °C 变性 10 s, AOA、AOB 和 CMX 的 <i>amoA</i> 基因的退火温度分别为 55 °C、55 °C 和 48 °C, 退火时间为 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 在 83 °C 下读板); 溶解曲线: 在 65~95 °C, 每增加 0.5 °C, 保持 5 s 读取荧光值	[7]
	Ntsp- <i>amoA</i> -359R	WAGTTNGACCACCASTACCA					

1.5 16S rRNA 基因 PCR 扩增及高通量测序

细菌多样性测定方法: 采用 16S rDNA 序列分析方法, 由上海美吉生物医药科技有限公司完成测定。16S rDNA 的 PCR 扩增: 引物为 515F 5'-GTGCCA GCMGCCGCGG-3' 和 907R 5'-CCGTC AATTCMTT RAGTTT-3'。PCR 的 20 μ L 混合反应体系包括 4 μ L 5 \times FastPfu Buffer, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L, 5 μ mol/L 的上、下游引物各 0.8 μ L, 0.4 μ L FastPfu Polymerase, 0.2 μ L BSA 和 10 ng 的样本 DNA。采用 ABI GeneAmp®9700 型 PCR 仪, 反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 29 个循环(95 °C 变性 30 s; 52 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 45 s); 72 °C 延伸 10 min。

测序数据处理: 将从 Illumina HiSeq 测序平台得到的初始数据根据 Barcode 序列拆分为不同样品数据, 并且截去 PCR 扩增引物序列和 Barcode 序列; 将拆分完成的数据应用 FLASH(V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) 对每个样品的 reads 进行拼

接, 拼接序列为原始 Tags 数据; 将原始 Tags 从连续低质量值(默认质量阈值 ≤ 3) 碱基数达到设定长度(默认长度值为 3) 的第一个低质量碱基位点截断, 进一步过滤去除其中连续高质量碱基长度小于 Tags 长度 75% 的 Tags; 与数据库(Gold database, http://drive5.com/uchime/uchime_download.html) 进行比对(UCHIME Algorithm, http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html), 检测嵌合体序列; 去除嵌合体序列得到最终的有效数据。

1.6 系统发育进化树构建

利用 MUSCLE(Multiple Protein Sequence Alignment) 软件对代表性序列进行多序列比对, 使用 Gblocks 提取保守序列, 然后用 IQ-tree 软件构建 AOA、AOB、NOB 的 16S rRNA 基因系统发育树, 通过“-m MF -T AUTO” 选择最佳进化模型, 利用最佳进化模型, 并设置参数“-FMP -bb 1000”, 进行进化树构建。

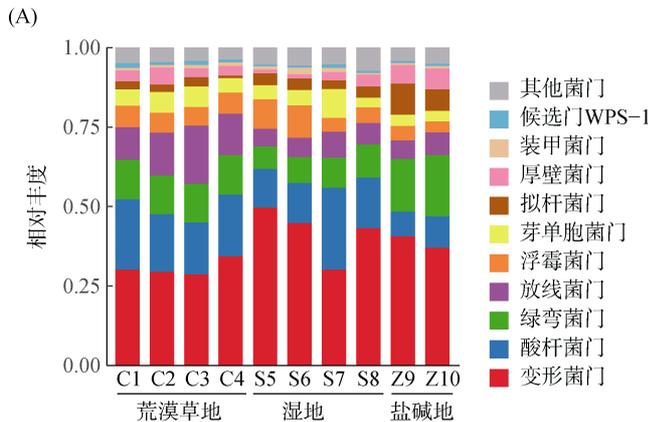
1.7 共现性网络构建

为了研究硝化微生物与非硝化微生物,以及硝化微生物与关键环境因子之间的关系,本研究进行了共现性网络(co-occurrence network)分析。筛选出至少在 5 个样本中出现的 OTU 之间所有可能的 Spearman 秩相关。如果 Spearman 相关系数(r)>0.6 且 P <0.05, 则 OTU 之间存在有效共现性。利用 Cytoscape v3.9.0 软件生成节点文件和边文件,并通过 Gephi v0.9.2 对网络进行了可视化。

2 结果

2.1 总微生物群落组成

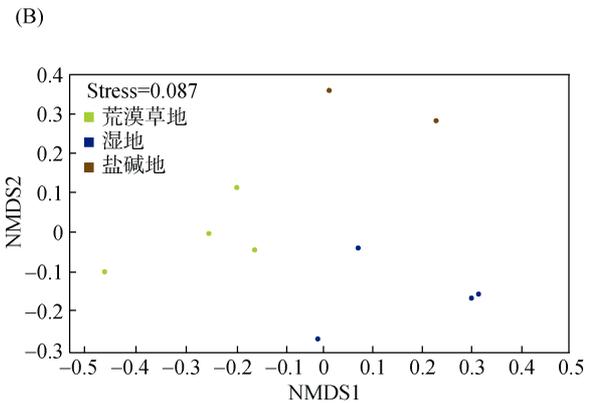
土壤总微生物 16S rRNA 基因扩增子测序发现,



变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、放线菌门(Actinobacteria)、浮霉菌门(Planctobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、装甲菌门(Armatimonadetes)和候选门 WPS-1(Candidate division WPS-1)是青藏高原 3 种生境中丰度最高的微生物类群(图 2A)。NMDS 分析发现,不同生境中样品微生物群落显著聚集,其中荒漠草地和湿地微生物群落结构较为接近(图 2B)。进一步的 Mantel test 分析发现, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 pH 是驱动总微生物群落结构的主要环境因子(图 2C)。

2.2 AOA、AOB 和 CMX *amoA* 基因丰度

基于 *amoA* 基因的 qPCR 结果揭示, AOA 在荒

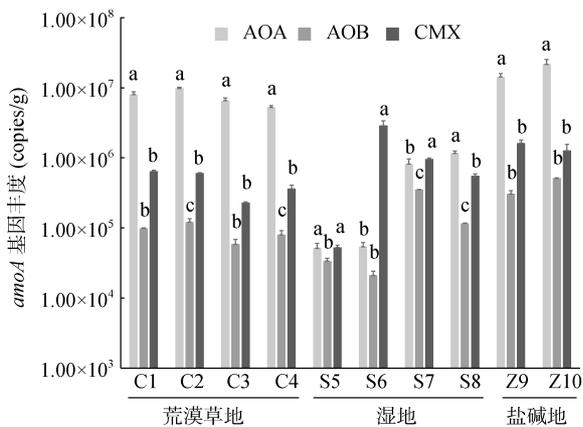


(C)

曼特尔检验	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	pH	TK	DOC	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	DON	TP	TN	TC
r	0.634 8	0.538 2	0.491 0	0.470 0	0.464 8	0.398 0	0.301 2	0.182 6	0.123 0
P	0.001	0.001	0.008	0.003	0.009	0.019	0.001	0.093	0.172

图 2 总微生物群落组成(A)、NMDS 分析(B)及与土壤理化性质的曼特尔检验(C)

Fig. 2 Total microbial community composition (A), NMDS analysis (B) and Mantel test with physiochemical properties of soils (C)



(图中不同小写字母表示同一生地不同氨氧化微生物间差异显著 (P <0.05))

图 3 基于荧光定量 PCR 的 AOA、AOB 和 CMX 的 *amoA* 基因丰度

Fig. 3 *amoA* gene abundances of AOA, AOB and CMX based on qPCR

漠草地和盐碱地两种生境中丰度最高,分别为 $5.26 \times 10^6 \sim 9.78 \times 10^6$ copies/g 和 $1.42 \times 10^7 \sim 2.15 \times 10^7$ copies/g, 是 AOB 和 CMX *amoA* 基因丰度的 1~2 个数量级(图 3)。而特别的是, CMX *amoA* 基因在绝大多数湿地样品中(4 个样品中的 3 个)丰度最高,分别为 $5.27 \times 10^4 \sim 2.87 \times 10^6$ copies/g, 其丰度与 AOA 的 *amoA* 基因丰度相当或高于 AOA, 显著高于 AOB 的 *amoA* 基因丰度(图 3)。

2.3 AOA、AOB 和 NOB 系统发育和群落组成

基于 16S rRNA 基因扩增子测序结果发现,青藏高原 3 种生境中 AOA 主要类群为土壤类群(即 group 1.1b), 且其中约半数以上属于最新发现的 *Nitrosocosmicus* 分支(图 4), 该分支也存在于北极冻土中^[8]。3 种生境中 AOB 类群结构也差异显著, 荒漠草地、湿地(4 个样品中的 3 个)主要为亚硝化螺菌

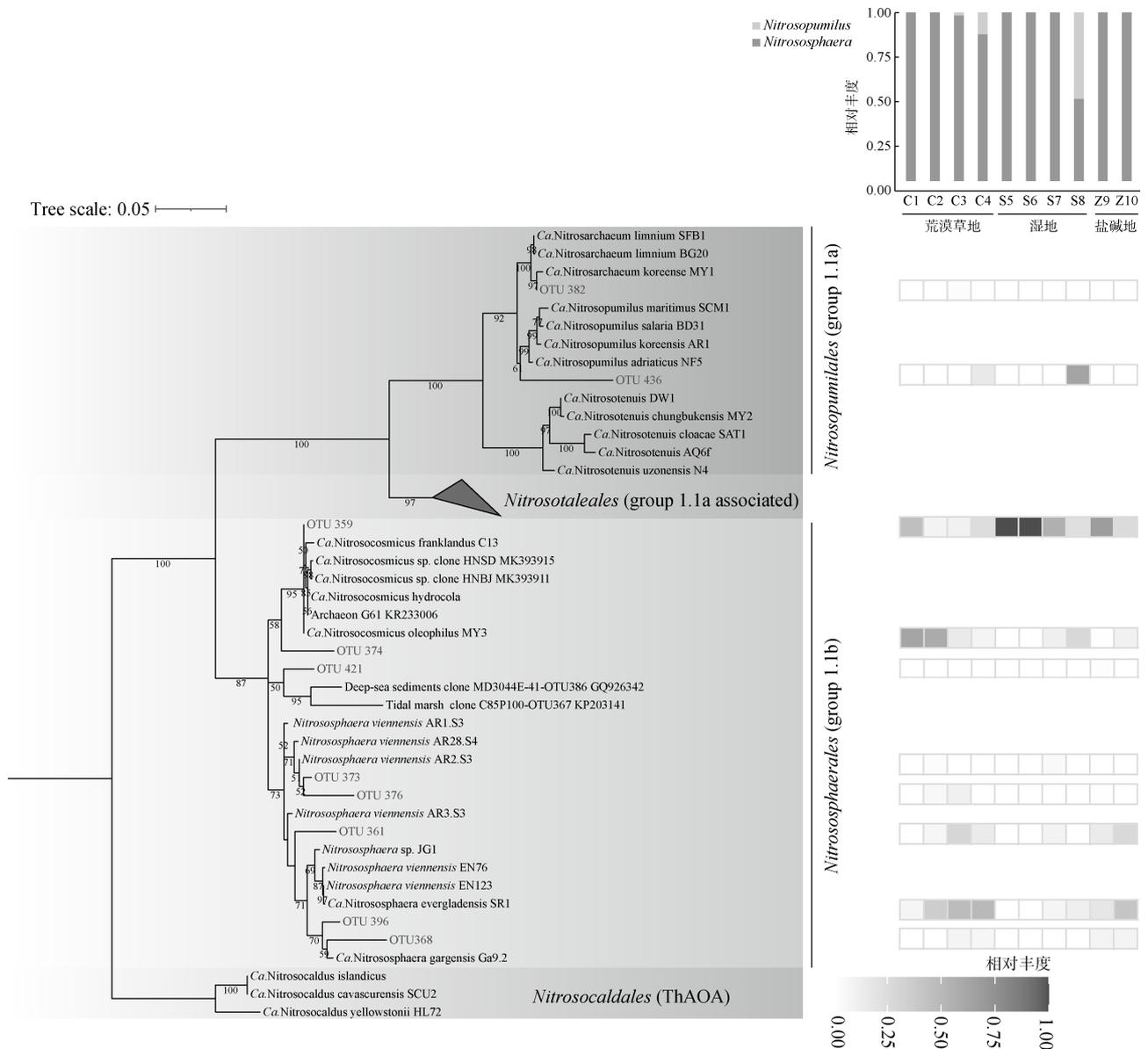


图 4 AOA 16S rRNA 基因序列系统发育进化树及在不同样本中的相对丰度

Fig. 4 The phylogenetic tree of AOA 16S rRNA genes sequences and the relative abundances in different samples

属(*Nitrosospira*, 71.21% ~ 100%), 而盐碱地主要为亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*, 75.51% ~ 88.71%) (图 5)。各生境中 NOB 主导类群均为硝化螺菌属(*Nitrospira*, 70.87% ~ 98.79%), 且 lineage II 是其主导分支。由于目前已知的 CMX 均属于该分支, 且经典 NOB 和 CMX 无法在 16S rRNA 基因水平进行区分, 因此 lineage II 同时包含了 CMX 的 16S rRNA 基因序列(图 6)。硝化菌属(*Nitrobacter*)仅占 3 种生境中 NOB 总序列数的 1.22% ~ 29.13%(图 6)。

特别的是, 在多个生境中检测到了典型海洋类群的硝化微生物, 如其中一个荒漠草地和一个湿地样品包含了较高比例的海洋类群 AOA(即 group 1.1a), 分

别为 12.77% 和 51.14%, 且主要为海岸口分支(图 4)。而在湿地的两个样品中均检测到了典型海洋来源的 AOB, 即亚硝化单胞菌属海洋谱系(*Nitrosomonas marina*), 丰度分别为 13.64% 和 29.51%(图 5); 而在湿地及盐碱地中均检测到了典型海洋分支的 NOB, 即 lineage 4, 丰度为 0.64% ~ 3.90%(图 6)。

2.4 硝化微生物网络互作关系

微生物共现性网络分析发现, AOA (*Nitrososphaera*) 和 *Nitrobacter* 与非硝化微生物物种间多为正相关连接, 分别占总连接数的 68.40% 和 92.13%(图 7A)。而 AOB(*Nitrosospira*)和 *Nitrospira* 与非硝化微生物物种间以负相关连接为主, 分别占总连接数的

65.19% 和 52.57%(图 7A)。进一步的硝化微生物与环境因子相关性网络分析发现, DON、DOC、TK 和 TP 是影响 AOA(*Nitrososphaera*)的主要环境因子(图 7B), 多种环境因子(除了 TC 和 NO_3^- -N)均与 AOB

(*Nitrospira*)有显著相关性, DOC、DON 和 NH_4^+ -N 等多种环境因子均与 *Nitrospira* 有显著相关性(图 7B), 而 *Nitrobacter* 只有 NO_3^- -N 与其有显著的相关性(图 7B)。

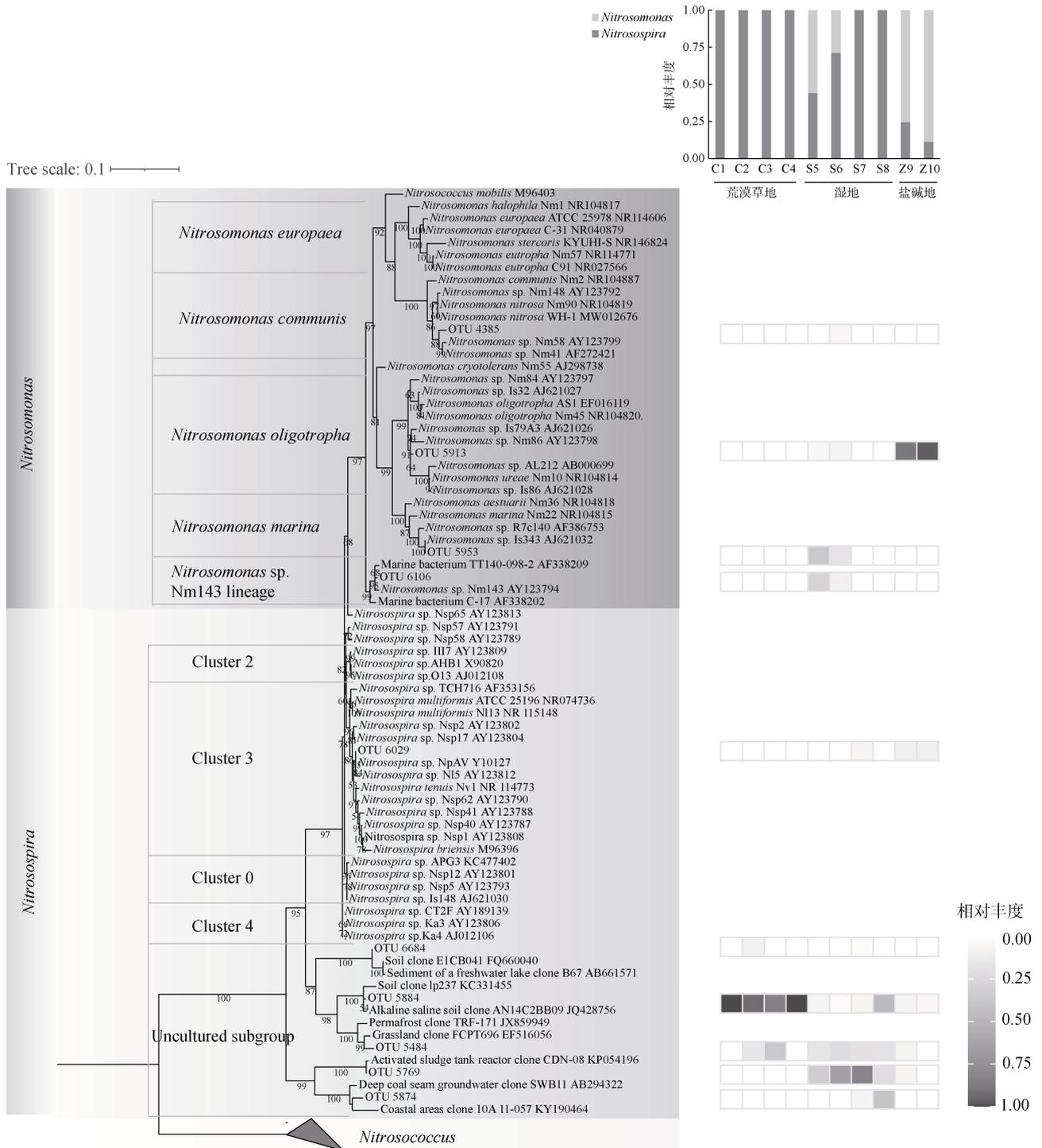


图 5 AOB 16S rRNA 基因序列系统发育进化树及在不同样本中的相对丰度

Fig. 5 Phylogenetic tree of AOB 16S rRNA genes sequences and relative abundances in different samples

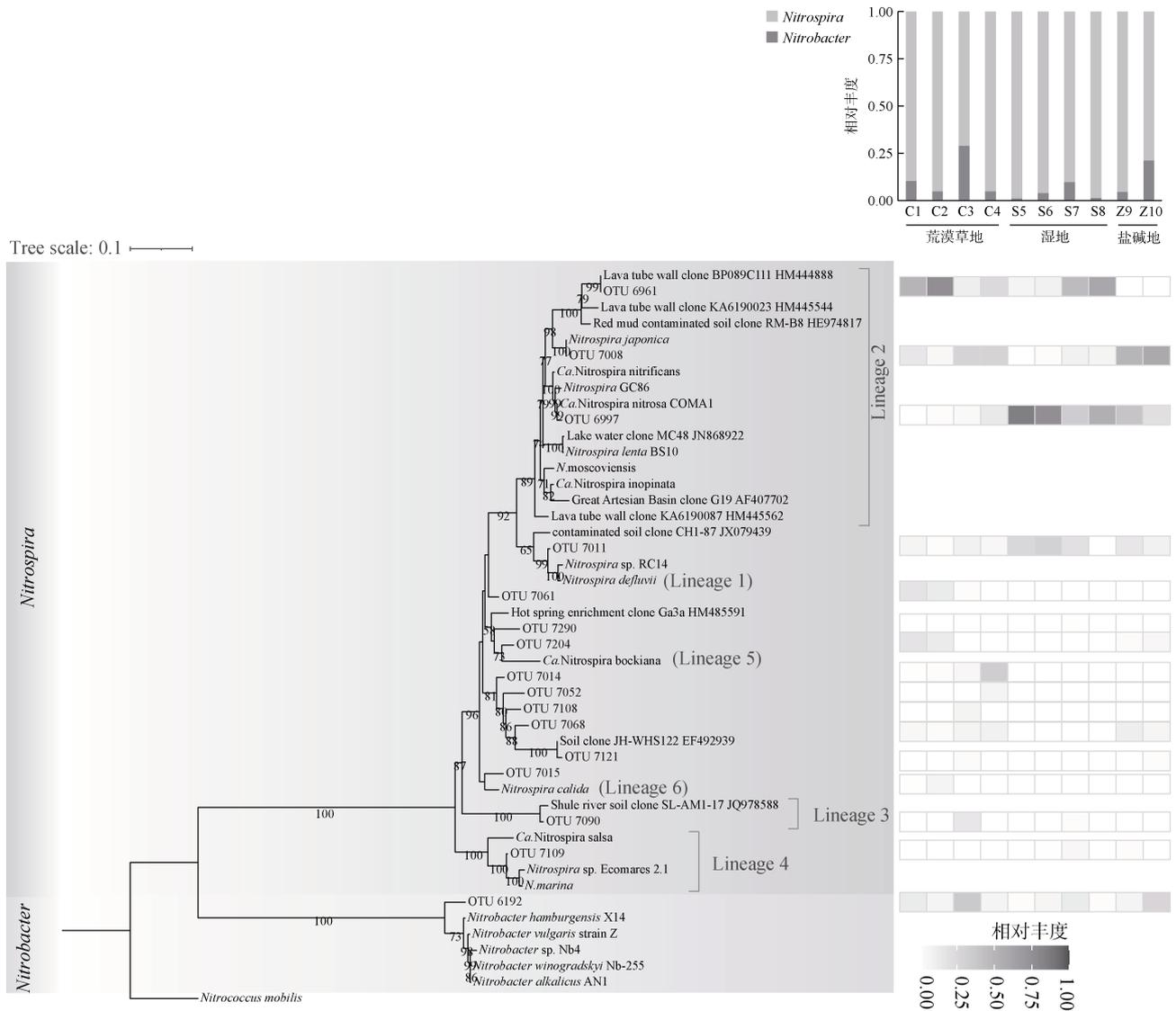


图 6 NOB 16S rRNA 基因序列系统发育进化树及在不同样本中的相对丰度

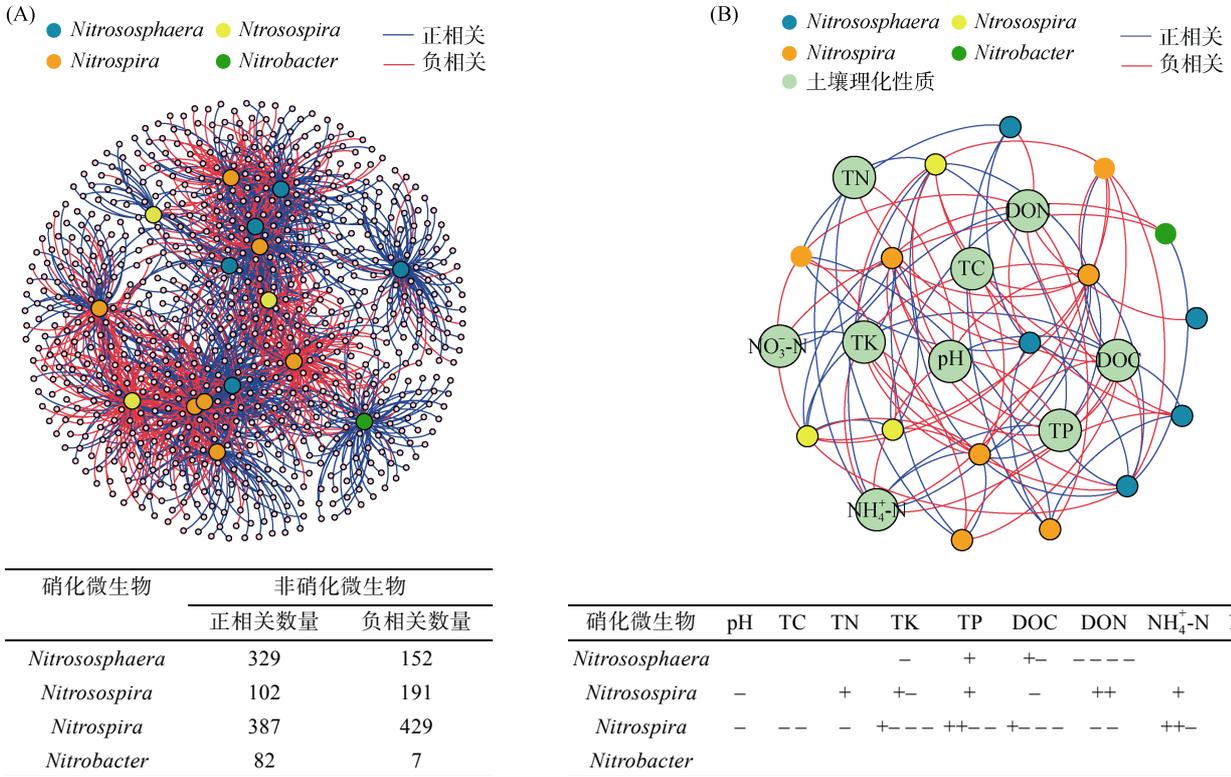
Fig. 6 Phylogenetic tree of NOB 16S rRNA genes sequences and relative abundances in different samples

3 讨论

青藏高原被称为地球的“第三极”，总面积高达 $2.62 \times 10^8 \text{ hm}^2$ ，其高寒气候条件和多样性的生境以及其古海洋环境，可能塑造了其独特的硝化微生物群落，然而目前对青藏高原硝化微生物种群特征及其分布规律仍知之甚少。本研究以荒漠草地、湿地和盐碱地 3 种典型生境为研究对象，系统分析了硝化微生物分布规律和群落结构特征，研究发现，AOA、AOB 和 NOB3 种硝化微生物在不同生境中具有独特的类群，如与北极冻土和海洋生境同类群的 AOA，且受 pH 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 等多种环境因子的影响。该研究加深了对青藏高原硝化过程微生物生态分布和群落结构的认知。

在土壤总微生物群落结构方面，发现 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和

pH 是影响 3 种生境总体微生物群落最重要的两个环境因子(图 2C)。而 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 pH 也是影响硝化微生物生理代谢活性和生态分布的关键环境因子，暗示了 3 种生境中硝化微生物群落结构和生态分布的特异性^[9]。比如，3 种生境中 AOA 主要类群为土壤类群(即 group 1.1b)，且其中约半数以上属于 *Nitrosocosmicus* 分支。含有 *Nitrosocosmicus* 类群的 *amoA* 序列最早发现于土壤生境，被称为 29i4^[10]，随后在北极冻土中富集到了该类群的菌株，证明该类群能够适应低温环境，这和青藏高原常年低温气候特点相互吻合^[8]。Wang 等^[11]通过稳定性同位素探针技术，首次明确证明该类群可以主导高铵投加条件下水稻土的氨氧化过程。随后国内外多个研究团队在污染土壤^[12]、旱地土壤^[13]、废水生境^[14]和水稻土^[15]中分离到了该类



(图 A 展示了硝化微生物与非硝化微生物的相互作用关系；图 B 展示了各硝化 OTU 与土壤理化性质的互作关系，“+”表示正相关，“-”表示负相关)

图 7 硝化微生物和其他微生物(A)、土壤理化性质(B)的共现性网络

Fig. 7 Co-occurrence network of nitrifying microorganisms and other microorganisms (A), soil physicochemical properties (B)

群的纯菌株，并把该类群命名为 *Nitrosocosmicus* clade^[12]，且发现该类确实可以耐受高浓度铵^[13]。Wang 等^[16]通过生长活性测定、基因组和转录组分析发现，该类群代表性菌株 *Ca. N. oleophilus* MY3 可以耐受酸性 pH 环境，而本研究的 3 种生境均偏碱性环境。由此可见，*Nitrosocosmicus* 类群可能是目前发现的温度、底物浓度和 pH 适应范围最为广泛的 AOA 类群。

在 5 000 万年前印度与欧亚板块开始碰撞逐渐形成目前的青藏高原之前，该地区曾经是特提斯古海洋 (Tethys Sea)。本研究在 3 种典型生境中大多检测出了典型海洋类群的硝化微生物，如荒漠草地和河流湿地中检出了 group 1.1a 分支的 AOA，且主要属于 estuarine/coastal marine clade^[16]；另有研究在湖泊中检出了典型海洋来源的 *Nitrosomonas marine* 类群的 AOB^[17]，在河流沉积物中检出了典型海洋分支的 NOB，即 lineage 4^[18]。这一特征在已经研究的农田土壤生态系统中包括湿地等生境的硝化微生物群落中极少发现^[9,11,16,19-21]，强烈暗示青藏高原硝化微生物类群除了受近代和当前环境影响，还可能受 5 000 万年前古海洋环境的影响。另外，值得注意的是，本研究中包括了典型的盐碱地，其具有较高的土壤盐

度，而荒漠草地和湿地也具有较高的 pH，这有可能是导致以上生境依然保留了部分海洋类群硝化微生物特征的原因之一。

完全硝化微生物(CMX)的发现改变了上百年来硝化微生物研究的经典范式^[3-4]。目前发现，CMX 在地下水、土壤、河流、湿地、废水处理系统和海岸口等多种生境中广泛分布，但在远洋海水中暂未发现其存在^[22-23]。而本研究首次在青藏高原高寒生态系统中发现 CMX 的存在，且在大多数河流湿地和湖泊湿地中其丰度显著高于 AOA 和 AOB。这说明 CMX 生境适应的广泛性，暗示 CMX 在青藏高原氮循环中可能发挥了重要作用。未来纯菌株分离、生理代谢特征和基因组研究，将有助于进一步加深对青藏高原 CMX 类群生理生态功能的认知。

总之，本研究较为完整地解析了青藏高原 3 种典型生境中硝化微生物群落结构和分布特征，对认知青藏高原氮循环和微生物生态和遗传进化具有重要意义。

4 结论

青藏高原荒漠草地和盐碱地中 3 种氨氧化微生物的丰度顺序为 AOA>CMX>AOB，而在湿地中则

为 $CMX \geq AOA > AOB$ 。3 种生境中 AOA 主要类群为土壤类群(即 group 1.1b), 且约 50% 属于 *Nitrosocosmicus* 分支, 该分支在北极冻土中也有发现, 暗示了该类群能够耐受低温的特征。荒漠草地和湿地中 AOB 主要类群为 *Nitrospira*, 而盐碱地主要为 *Nitrosomonas*。3 种生境中 NOB 主要类群均为 *Nitrospira*。clade A 和 clade B 分支的 CMX 在各生境均存在, 且二者比例相当。特别的是, 大多生境中存在典型海洋来源的硝化微生物类群, 如 group 1.1a 的 AOA、*N. marina* 的 AOB、Lineage 4 的 NOB, 这强烈暗示青藏高原硝化微生物可能受青藏高原古海洋环境的影响。

参考文献:

- [1] Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(5): 263–276.
- [2] Winogradsky S. Contributions a la morphologie des organismes de la nitrification[J]. *Arkiv Biologischeski Nauk (St. Petersburg)*, 1892, 1: 87–137.
- [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] Daims H, Lebedeva E V, Pjevac P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 504–509.
- [5] 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.
- [6] Rothauwe 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.
- [7] Zhao Z R, Huang G H, He S S, et al. Abundance and community composition of comammox bacteria in different ecosystems by a universal primer set[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 691: 146–155.
- [8] Alves R J E, Wanek W, Zappe A, et al. Nitrification rates in Arctic soils are associated with functionally distinct populations of ammonia-oxidizing Archaea[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(8): 1620–1631.
- [9] 唐修峰, 秦华, 匡璐, 等. 基于宏基因组学的酸性森林土壤氨氧化微生物群落特征研究[J]. *土壤学报*, 2021, 58(5): 1311–1321.
- [10] Quaiser A, Ochsenreiter T, Klenk H P, et al. First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeote from soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(10): 603–611.
- [11] 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.
- [12] Jung M Y, Kim J G, Sinnighe Damsté J S, et al. A hydrophobic ammonia-oxidizing archaeon of the *Nitrosocosmicus* clade isolated from coal tar-contaminated sediment[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2016, 8(6): 983–992.
- [13] Lehtovirta-Morley L E, Ross J, Hink L, et al. Isolation of ‘Candidatus *Nitrosocosmicus franklandus*’, a novel ureolytic soil archaeal ammonia oxidiser with tolerance to high ammonia concentration[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(5): fiv057.
- [14] 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.
- [15] Liu L T, Li S R, Han J M, et al. A two-step strategy for the rapid enrichment of *Nitrosocosmicus*-like ammonia-oxidizing thaumarchaea[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 875.
- [16] Wang B Z, Qin W, Ren Y, et al. Expansion of Thaumarchaeota habitat range is correlated with horizontal transfer of ATPase operons[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(12): 3067–3079.
- [17] Speksnijder A G C L, Kowalchuk G A, Roest K, et al. Recovery of a *Nitrosomonas*-like 16S rDNA sequence group from freshwater habitats[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1998, 21(2): 321–330.
- [18] Zhao M Y, Tang X F, Sun D Y, et al. Salinity gradients shape the nitrifier community composition in Nanliu River Estuary sediments and the ecophysiology of comammox *Nitrospira inopinata*[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 795: 148768.
- [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] Zhao J, Wang B Z, Zhou X, et al. Long-term adaptation of acidophilic archaeal ammonia oxidisers following different soil fertilisation histories[J]. *Microbial Ecology*, 2022, 83(2): 424–435.
- [21] 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.
- [22] Wang X X, Lu L, Zhou X, et al. Niche differentiation of comammox *Nitrospira* in the mudflat and reclaimed agricultural soils along the north branch of Yangtze River Estuary[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 11: 618287.
- [23] Daims H, Lückner S, Wagner M. A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria[J]. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(9): 699–712.