

好氧氨氧化微生物系统发育及生理生态学差异

于少兰 乔延路 韩彦琼 张晓华*

(中国海洋大学 海洋生命学院 山东 青岛 266003)

摘要: 作为好氧氨氧化的驱动者, 氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)和细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)一直是氮的生物地球化学循环的研究热点之一。由于它们的相对丰度、群落结构和活性因环境而异, 目前二者对全球氮循环的相对贡献仍存在争议。对培养物和环境样品的动力学、基因组学等研究结果表明, 这种差异主要是由 AOA 和 AOB 的生理生态学差异导致的。氨浓度、pH、溶氧、温度等环境因素以及代谢途径等生理因素导致 AOA 和 AOB 的生态位分化。通过比较 AOA 和 AOB 在系统发育、对环境因子的响应以及代谢途径等方面的差异, 对好氧氨氧化微生物相关研究成果进行概括和总结, 以便深入了解它们在不同环境中对氮循环的相对贡献; 同时对好氧氨氧化微生物今后的研究重点进行了展望。

关键词: 氨氧化细菌, 氨氧化古菌, 系统发育, 环境因子, 代谢途径

Differences between ammonia-oxidizing microorganisms in phylogeny and physiological ecology

YU Shao-Lan QIAO Yan-Lu HAN Yan-Qiong ZHANG Xiao-Hua*

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: The roles of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA), as drivers of ammonia oxidation, in nitrogen cycle have been one of the most attractive topic in the field of microbial ecology. The relative importance of AOA and AOB in nitrogen cycle currently is still under debate since significant variations in the relative abundance, community structure and activity between them under different environmental conditions were observed. This discrepancy could be attributed to differences in the physiological ecology of AOA and AOB as evidenced by kinetics and genomes of cultures and environmental samples studies. Metabolic pathway and environmental factors like ammonia concentration, pH, dissolved oxygen and temperature were potential factors causing niche differentiation between AOA and AOB. Here, current knowledge of differences in the physiology, phylogeny, environmental responses and metabolic pathway between AOA and AOB were summarized, in order to gain deep insight into their relative contribution to nitrogen cycling under different environments. Finally, the future perspectives of AOA and AOB were proposed.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41376088)

*通讯作者: Tel: 86-532-82032767; ✉: xhzhang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2015-02-02; 接受日期: 2015-04-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-24

Keywords: Ammonia-oxidizing bacteria, Ammonia-oxidizing archaea, Phylogenetics, Environmental factors, Metabolic pathway

硝化作用是氮的生物地球化学循环的关键环节,包括好氧氨氧化和亚硝酸盐氧化两部分,分别由好氧氨氧化微生物和亚硝酸盐还原细菌介导。其中,好氧氨氧化作为硝化作用的主要限速步骤,受到广泛关注。在第一株氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)被成功分离后的一个多世纪里, AOB 都被认为是唯一具有氨氧化能力的微生物,直到 21 世纪初,古菌氨单加氧酶 α 亚基基因(Ammonia monooxygenase α -subunit, *amoA*)的发现^[1]以及氨氧化古菌 *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 的分离培养^[2],才使好氧氨氧化微生物从细菌域扩展到古菌域。氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)的发现,重新激起了人们对氨氧化微生物的研究热情。目前,在土壤、湖泊、河口、深海、污水处理池等多种环境中均发现了大量 AOA 和 AOB 的 16S rRNA 基因、*amoA* 基因^[3-6]。好氧氨氧化过程常与反硝化或厌氧氨氧化等过程耦合产生 N_2 ,起到氮移除的作用,对生态系统氮平衡、水体富营养化、土壤肥力等具有重要影响;另外,在废水处理生物脱氮工艺中,无论是传统的硝化-反硝化工艺还是新型的氨氧化-反硝化/厌氧氨氧化工艺,氨氧化都是其核心环节。因此, AOA 和 AOB 的研究对环境保护、工农业生产等都具有重要意义。虽然好氧氨氧化微生物的生理学、生态学、基因组学、蛋白质组学等方面的研究使我们对它们有了一定了解,但由于研究方法的限制及其分布的复杂性和对环境胁迫的敏感性,目前仍无法确定 AOA 和 AOB 对全球氮循环的相对贡献,也尚不清楚如何调控它们的活性使其在生态修复、废水处理等方面发挥重要作用。其生理生态学差异将有助于我们进一步研究不同环境中 AOA 和 AOB 的群落组成和活性,但目前很少有文章将两者进行比较。本文将通过 AOA 和 AOB 的比较,从系统发育、对环境因子的响应、代谢途径等方面对氨

氧化微生物相关研究成果进行概括和总结。

1 好氧氨氧化微生物系统发育

虽然目前已培养的 AOA 和 AOB 种类较少,但克隆文库、高通量测序技术等为我们研究其系统发育提供了大量序列信息。16S rRNA 基因是研究微生物进化关系及群落结构常用基因,在好氧氨氧化微生物中 *amoA* 基因与 16S rRNA 基因的系统发育树重合性较好,且相对于 16S rRNA 基因, *amoA* 基因表现出更高的差异性,可以更好地区别 16S rRNA 基因相似性较高的不同种。因此, *amoA* 作为分子标记广泛应用于环境氨氧化微生物群落结构研究中。

1.1 氨氧化古菌

2008 年,科学家们通过系统发生学和酶学分析,将包括氨氧化古菌在内的部分泉古菌类群重新划分成一个新门——奇古菌门^[7]。根据 16S rRNA 和 *amoA* 基因的系统发育分析,目前已知的 AOA 划分为 Group I.1a、Group I.1b、ThAOA 和 Group I.1a-associated 四个类群。*N. maritimus* SMC1 是第一株分离培养的氨氧化古菌^[2],属于 Group I.1a 类群,它的发现使古菌的氨氧化功能得到证实,是好氧氨氧化微生物研究的重要里程碑。之后,人们又成功地从贫瘠土壤、淡水沉积物、农田等多种环境中富集了 Group I.1a 菌株^[8-10]。最近,从地热温泉中富集的 *Nitrosotenuis uzonensis* 扩大了我们对此类 AOA 分布的认识^[11]。2008 年,第一株 Group I.1b 氨氧化古菌 *Nitrososphaera gargensis* 从热泉微生物席中被分离培养^[12]。随后又有多株 Group I.1b 中的 AOA 被富集或分离,其中 *Nitrososphaera viennensis* EN76 是第一株从土壤环境中分离培养的 AOA,它的纯培养为在土壤环境中广布的 Group I.1b 类群古菌的研究提供了模式生物,是中温古菌研究的又一里程碑^[13]。*Nitrosocaldus yellowstonii* 则代表了在高温环境中广泛存在的一个分支——嗜热 AOA 类群 ThAOA^[14]。2011 年富集到的 *Nitrosotalea*

devanatertra 是目前唯一的专性嗜酸氨氧化微生物, 隶属于 Group I.1a-associated 类群^[15]。酸性土壤约占无冰陆地表面 30%, 并且其中的硝化反应速率较高, 是研究全球氮循环不可缺少的一环, 所以这个发现为进一步研究氮的生物地球化学循环提供了重要条件。

除了上述已分离或富集培养的 AOA 之外, 基于 *amoA* 基因克隆文库的分析表明, 自然环境中还存在大量未知 AOA。2012 年 Pester 等将从 NCBI、IMG/M 以及 Camera 3 个数据库中获得的所有古菌 *amoA* 序列用距离矩阵法、最大简约法和最大似然法 3 种方法建树, 划分为 5 个簇^[16], 其中 *Nitrosopumilis*、*Nitrososphaera*、*Nitrosocaldus*、*Nitrosotalea* cluster 分别对应已知 AOA 分类中的 Group I.1a、Group I.1b、ThAOA 和 Group I.1a-associated 类群, 而 *Nitrososphaera* sister cluster 类群中还未有 AOA 被描述。*Nitrosopumilis* cluster 在海洋水体和沉积物 AOA 中占主导地位, 而 *Nitrososphaera* cluster 则主要存在于土壤以及潮间带、河口等低盐环境中。

1.2 氨氧化细菌

目前为止, 已知的 AOB 均属于 β -变形菌纲的亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)和 γ -变形菌纲的亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)。Purkhold 等根据 16S rRNA 基因的系统发育树将 β -变形菌纲中的 AOB 分为 10 个簇^[17]。Avrahami 等根据 *amoA* 基因系统发育树将 β -变形菌纲中的 AOB 分为 12 个簇^[18], 其簇与 16S rRNA 基因系统发育树中的相对应, 并新增加了 *Nitrosospira* cluster 9–12。2010 年 Dang 等又在此基础上新划分出 3 个簇 *Nitrosospira* cluster 13–15^[19]。其中, *Nitrosospira* cluster 2、3、4、10、11、12 及 *Nitrosomonas* cluster 7 是土壤中主要的氨氧化细菌类群, 土壤酸度及氨浓度是影响其分布模式的主要环境因子^[20-21]。*Nitrosomonas* cluster 6a 则是淡水生态系统、废水以及生物滤池中的主要类群, 在河口

和近岸等受淡水、废水影响较大的低盐环境中也有发现^[3,17]。海洋环境中存在大量 Cluster 13–15 氨氧化细菌类群: Cluster 13 主要分布在近岸海洋环境中; Cluster 14 在近岸和深海的高盐度环境均有发现; 而 Cluster 15 则主要存在于近岸和河口, 特别在河口环境中尤为常见^[3,19]。由于缺少相应已培养的 AOB, Cluster 9–15 在 16S rRNA 基因进化树上还无法找到与其对应的分支, 需要通过更多的纯培养 AOB 和克隆序列来进一步确定。

在已纯培养的 AOB 中, *Nitrosomonas europaea* 作为研究好氧氨氧化微生物生理、生化和系统发育等方面的模式生物之一^[22-24], 是目前研究最多的氨氧化微生物。*Nitrosococcus oceani* 是 γ -变形菌纲中唯一在海洋环境中广泛存在的种^[25]。2014 年, Urakawa 等又定义了一个新种 *Nitrosospira lacus*, 其标准菌株 APG3 分离自淡水湖沉积物, 是一株耐寒、广 pH 的陆源氨氧化细菌^[26]。这种具有独特生境选择的 AOB 为自然界中氨氧化微生物的微生物生态学研究提供了新的认知。

2 对环境因子的响应

AOA 和 AOB 的群落结构、丰度和活性在不同环境中具有差异性, 根本原因在于二者对环境因子的响应不同。

2.1 氨

控制好氧氨氧化微生物分布的主要因素之一是底物($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$)浓度。对于培养的 AOA 和 AOB 的动力学研究表明, 大部分 AOB 的半饱和常数 K_m 值较高($>20 \mu\text{mol/L}$), 只有少数的几株对底物浓度要求较低, 如 *Nitrosomonas ureae* 和 *Nitrosomonas oligotropha*^[27]。而 AOA 的 K_m 值($<1 \mu\text{mol/L}$)和可耐受氨的最大浓度普遍较低^[28], 尤其是 Group I.1a 中的 *N. maritimus* SCM1 底物的半饱和常数极低($K_m=133 \text{ nmol/L}$), 且其可耐受的氨的最高浓度不超过 1 mmol/L ^[29]。另外, 在 AOA 占主导地位的普吉特海湾和马尾藻海水体中, 氨氧化微生物的 K_m 值也极低($<100 \text{ nmol/L}$)^[30-31], 表明在海洋原位环境中

AOA 对氨也具有极高的亲和力。对不同环境样品和培养物中 AOA 和 AOB 的活性及丰度的检测结果同样证明了 AOA 比 AOB 更适合寡营养环境: 在淡水沉积物的 AOA 和 AOB 富集培养物中, NH_3 的增加可以提高 AOB 的生长速率, 而对于 AOA 的生长速率则有所抑制^[9]; 土壤环境样品中, AOB 只在 NH_4^+ -N 浓度较高(200 $\mu\text{g/g}$)的条件下才能生长, 而 AOA 在 NH_4^+ -N 浓度 < 0.5 $\mu\text{g/g}$ 的条件下仍可生长^[5], 且在含氮量高的草原土壤中, AOB 的丰度和活性随 NH_4^+ -N 浓度升高而增加, 并与硝化活性呈正相关^[32]; 在寡营养的开放性海域, AOA 的丰度高于 AOB 并且与硝化速率有很高的相关性^[33-34]; 而在富营养的污水处理厂活性污泥里, AOB 的活性和丰度更高^[6]。因此 AOB 可能在富营养化的水体、施肥土壤、污水处理池等 NH_4^+ 浓度较高的环境下的氨氧化过程中发挥重要作用, 而 AOA 则是寡营养环境下氨氧化作用的主要执行者。氨的浓度对 AOA 和 AOB 群落结构也有影响, 在北极沿海和大西洋热带海区上层水体中主要的 AOA 类群为适中氨类群 HAC-AOA, 而在氨浓度极低的大西洋热带海水中、下层水体中适低氨类群 LAC-AOA 占有优势^[35]; 对象山湾 AOB 群落结构研究表明, 污染程度不同的近岸站和远岸站的 AOB 群落分别聚集成簇, 其分布模式与 NH_4^+ -N 浓度显著相关^[36], 同样的结果在长江口潮间带也被报道^[37]。

2.2 温度

温度是影响氨氧化微生物分布模式的重要环境因素之一: 在土壤、湖泊、海洋等中温环境中包括 *Nitrosoarchaeum limnia*、*N. koreensis*、*N. maritimus* 等在内的适中温类群占主导地位, 而包括 *N. yellowstonii* 和 *N. gargensis* 等在内的嗜热类群则是热泉环境中常见类群。同样, 温度对 AOB 群落结构也有重要影响, 例如: 在珠江口到南海的深海站位与浅海站位沉积物 AOB 群落结构存在明显差异, 温度是造成这种差异的主要原因之一^[3]; 在北美森林、荒漠、草地等土壤中, 温度的年度差异与

AOB 群落结构变化密切相关^[38]。以往研究表明, AOA 对高温环境的适应性高于 AOB: 已培养的 *N. yellowstonii* 的最适温度高达 72 °C, 在 60–74 °C 下具有较高的亚硝酸盐产生速率^[14], 甚至在温度高达 97 °C 的热泉环境中仍可检测到 *N. yellowstonii* 和 *N. gargensis* 相关类群古菌的 *amoA* 相关基因及其转录产物。热泉环境中氨氧化是产能最多的生理过程之一, AOA 在此过程中起着至关重要的作用^[39]。而已培养的 AOB 的最适温度一般在 20–30 °C, 且目前为止还未在恒温高于 40 °C 的环境中检测到 AOB 的相关基因。温度不但影响着 AOA 和 AOB 的群落结构和活性, 且对其多样性水平也有影响: 对中国海域沉积物中氨氧化微生物研究结果表明 AOA 的多样性在位于热带的南海地区相对较高, 而 AOB 的多样性则在位于温带的黄、渤海区较高^[3,19,34]。

2.3 溶氧

在很多 AOA 占主导地位的环境中, 溶氧量 (Dissolved oxygen, DO) 都较低。在南太平洋东部的热带少氧海区水体及低氧的阿拉伯海水体中 AOA 的丰度均较高, 且高于 DO 值较高的表层水体^[40]。在珠江口 DO 值 < 1 mg/L 的水体中, AOA 占主导地位的 Marine group I 类群的相对丰度明显高于 DO 值 > 5 mg/L 的水体^[41]。虽然 AOA 对低氧环境有很强的偏好性和适应性, 但是好氧氨氧化是一个严格需氧的过程, 氧气的可利用性对于 AOA 的分布和活性有重要影响。在阿拉伯海 DO 浓度约为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的上层低氧水体中 AOA 的丰度和活性较高, 而在 600–750 m 氧气浓度低于检测极限时, AOA 的丰度及 *amoA* 基因的转录产物也最少, 说明此时氧气的浓度已不足以支持 AOA 的氨氧化作用^[42]。与 AOA 相比, AOB 对环境 DO 量要求较高: Abell 等发现在不同溶氧处理的沉积样品中, 细菌 *amoA* 基因的转录量随着 DO 浓度的降低而减少, 且不同 DO 条件下的转录的细菌 *amoA* 类型也不同, 但是古菌 *amoA* 的转录量和转录类群在不同溶氧样品间没有明显变化^[43]; 在旱地土壤中, 深层缺氧土

层 AOA 的丰度较表层无明显变化, 而 AOB 的丰度则急剧降低^[44], 类似结果在湿地土壤、湖泊沉积物等样品中也有报道^[45-46]。另外, 在含氧量较低 (<10 $\mu\text{mol/L}$) 的水体中 AOA 的丰度明显高于 AOB^[47]。对富集或纯培养的氨氧化微生物的动力学研究表明 AOA 的氨单加氧酶 (Ammonia monooxygenase, AMO) 展现出更高的氧气亲和力^[48-49]。综上所述, AOA 对低氧环境的适应性更强, 在低氧的海水、土壤、沉积物等环境中对硝化作用的贡献可能大于 AOB。

2.4 pH

在酸性红土中 AOB 的 *Nitrosospira* 类群中的 Cluster 10、11 和 12 占有优势, 而 *Nitrosospira* 的 Cluster 3a.1、3a.2 及 *Nitrosomonas* 的 Cluster 6 和 7 主要存在于碱性和中性土壤中^[21]。AOA 中的 Group 1.1a 的丰度与土壤 pH 值成反比, 而 Group 1.1b 的丰度与 pH 值成正比^[21]。尽管不同分支间 pH 的偏好存在差异, 但从总体水平上来说 AOA 对酸性环境的适应性高于 AOB。虽然目前为止只培养出一株专性嗜酸 AOA, 但是 *Nitrososphaera* cluster 和其他 *amoA* 分支在酸性土壤中的广泛存在表明还有其他适应低 pH 的 AOA^[16,50], 而 AOB 在低 pH 的环境中丰度和活性很低甚至为零^[51]。贾仲君课题组发现, 在酸性土壤中 *Nitrososphaera* clusters 的 AOA 是氨氧化过程的主要参与者^[52-53]。另外, 贺纪正课题组研究表明, 在不同 pH 土壤中, AOA 和 AOB 群落对环境变化的响应不同: 在酸性红土中, 长期施肥会引起 AOA 群落结构显著变化^[54]; 而在同样长期施肥的碱性土壤中 AOB 的群落组成变化显著^[55]。在酸性土壤环境中潜在硝化速率与 AOA 的丰度显著相关而与 AOB 丰度无关^[56-57], 而在碱性土壤中的研究结果恰好相反^[55]。以上研究表明, AOA 可能在酸性土壤中的氨氧化过程中发挥主要作用, 而 AOB 则是碱性土壤中对氨氧化起主导作用的微生物。另外, 在 pH 较低的海黄及渤海表层沉积物中, AOA 占主导地位的 Marine group I 类群在古菌中的相对丰度高于 pH 较高的东海北部沉积^[58]; 在珠江

口水体中, 其相对丰度在 pH 较低的上游高于 pH 较高的下游地区, 表明 AOA 可能较其他古菌更能适应较低 pH^[41]。说明在营养较丰富的边缘海, 低 pH 沉积物中 AOA 对氨氧化作用的贡献可能较高 pH 区更突出。

此外, 光照、盐度、金属离子等因素也对氨氧化微生物的分布有一定的影响。

3 代谢途径

3.1 氨氧化

在 AOB 中, AMO 催化氨的好氧化生成羟胺, 羟胺被周质的羟胺氧化还原酶 (Hydroxylamine oxidoreductase, HAO) 氧化成亚硝酸盐。具体反应如下: (1) $2\text{H}^+ + \text{NH}_3 + 2\text{e}^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$; (2) $\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + 4\text{e}^- + 5\text{H}^+$ 。其中第二步生成的电子中有两个电子用来补偿第一步反应, 剩下的两个电子经过电子传递链传递到末端氧化酶从而形成质子动力势; (3) $2\text{H}^+ + 1/2\text{O}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ (图 1)。对于古菌 *N. maritimus* 的氨氧化作用化学计量学分析表明其产生亚硝酸根所需的氧气和氨的相对量与 AOB 的相似, 它们总反应式为 $\text{NH}_3 + 1.5\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$ ^[29]。Vajrjala 等通过稳定同位素示踪法发现 *N. maritimus* 的氨氧化过程中有 NH_2OH 的产生和消耗并且伴随着能量的产生, 证明羟胺是其氨氧化过程的中间产物, AOA 中的氨氧化过程可能与 AOB 相似^[59], 但是目前 AOA 的具体氨氧化过程尚未探明。在已知的 AOA 的基因组中还没有发现类似于 AOB 中的羟胺氧化还原酶基因 *hao*, 可能在 AOA 中存在未知的酶可代替 HAO 氧化羟胺。另外, 也有观点认为古菌的 AMO 或其他酶催化反应可能产生 HNO, HNO 被硝酰氧化还原酶 (Nitroxyl oxidoreductase, NxOR) 氧化生成 NO_2^- ^[60]。而且与 AOB 相比, AOA 中没有细胞色素 *c* 基因而是存在大量编码多铜氧化酶和质体蓝素域蛋白的基因, 这表明 AOA 的电子传递机制与 AOB 不同^[60-61]。

3.2 固碳

通常认为氨氧化微生物是能利用氨作为唯一

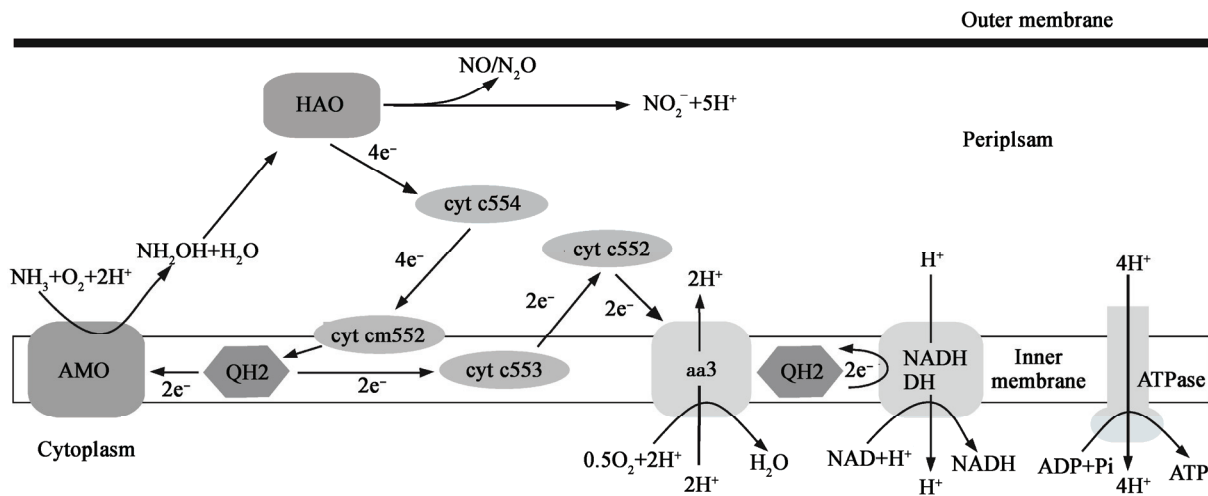


图1 AOB中氨氧化过程及其电子传递途径(基于[27])

Figure 1 Pathway for ammonia oxidation and the electron transport chain in AOB (modified from [27])

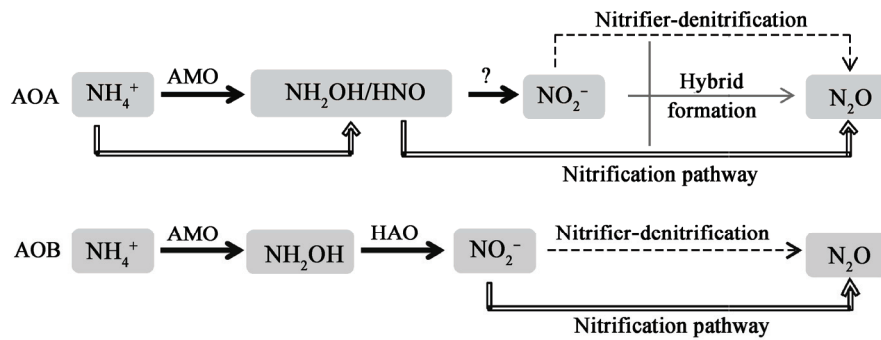
注: AMO: 氨单加氧酶; HAO: 羟胺氧化还原酶; cyt c: 细胞色素 C; aa3: 细胞色素氧化酶 aa3; QH2: 还原型辅酶 Q; NADH DH: NADH 脱氢酶; ATPase: ATP 合成酶。

Note: AMO: Ammonia monooxygenase; HAO: Hydroxylamine oxidoreductase; cyt c: Cytochrom c; aa3: Cytochrome oxidase aa3; QH2: Reduced coenzyme Q; NADH DH: NADH dehydrogenase; ATPase: ATP synthase.

能源、以 CO_2 作为主要碳源的化能自养微生物, 但是 AOA 和 AOB 在固碳方面存在重要差异。AOB 通过卡尔文循环固碳, 每固定 1 分子的 CO_2 需消耗 3 分子的 ATP 和 2 分子的 NADPH, 据估计其产生的能量 80% 用来固碳^[62]。而 AOA 基因组中包含乙酰辅酶 A/丙酰辅酶 A 羧化酶、甲基丙二酰辅酶 A 差向异构酶和变位酶、4-羟基丁酸脱氢酶等酶的编码基因, 通过 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸 (3-Hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate, 3HP/4HB) 途径固碳^[60,63]。研究表明, AOA 固定 CO_2 的方式最节能, 固定等量 CO_2 所消耗的能量是 AOB 的 2/3, 比拥有相似固碳途径的泉古菌消耗的能量还要低, 这为它们在寡营养环境中生存提供了条件^[64]。不同的固碳途径对氨氧化微生物生态适应性有重要影响: 3HP/4HB 途径中固定的是 HCO_3^- , 而 HCO_3^- 是海洋环境中主要的碳素存在形式, 这为 AOA 在海洋中的广泛分布提供了条件; 而卡尔文循环固定的是 CO_2 , 且在 AOB 的基因组中有碳酸酐酶编码基因^[65], 可以将 HCO_3^- 转化成 CO_2 , 因此 AOB 利用的无机碳源范围更广。

3.3 产 N_2O

研究表明 AOA 和 AOB 都能产生 N_2O 。在 AOB 中主要通过 2 种途径生成 N_2O : 在有氧条件下, 羟胺在 HAO 的作用下氧化成 NO, 进而形成 N_2O ^[66]; 在低氧条件下, AOB 主要通过硝化菌反硝化作用在亚硝酸盐还原酶的作用下将亚硝酸还原成 NO, 再经一氧化氮还原酶 (Nitric oxide reductase, NOR) 还原成 N_2O ^[67]。与 AOB 不同, 目前对于 AOA 产生 N_2O 的代谢过程仍然存在争议, 因为在 AOA 的基因组中既缺少类似于 AOB 中的 *hao* 基因, 又缺少参与硝化菌反硝化作用的 *nor* 基因。Löscher 等研究表明 AOA 可通过未知的中间产物在氨氧化过程中产生 N_2O ^[68]。Jung 等通过同位素示踪证明土壤 AOA 富集物产生的 N_2O 存在 $^{15,15}\text{N}_2\text{O}$ 、 $^{14,15}\text{N}_2\text{O}$ 、 $^{14,14}\text{N}_2\text{O}$ 3 种形式, 它们可能分别由氨氧化、硝化菌反硝化作用及两个代谢途径结合产生^[69]。而纯培养的 *N. viennensis* 可能通过混合形成机制产生 N_2O , 在这个过程中来源于亚硝酸的 N 原子与来源于氨或者氨氧化作用中间产物的 N 原子通过酶学反应结合生成 N_2O ^[70]。具体过程如图 2 所示^[71]。

图 2 AOA 和 AOB 产 N_2O 的途径(基于[71])Figure 2 Pathway leading to N_2O production of AOA and AOB (modified from [71])

4 展望

基于 16S rRNA 和 *amoA* 基因的研究揭示了好氧氨氧化微生物的群落结构特征, 而同位素示踪技术及全基因组测序技术的应用使我们对好氧氨氧化微生物生态作用机理有了更多了解。但是, 目前仍然存在很多需要努力的方面, 如: (1) 探求 AOA 的具体氨氧化途径, 特别是明确催化羟胺氧化的酶及其相关基因; (2) AOB 与亚硝化细菌间相互依存的关系是两种功能微生物代谢耦合的典型范例, 但 AOA 和亚硝酸盐氧化细菌之间的关系尚不清楚; (3) 尽管分子生物学研究表明自然环境中 AOA 和 AOB 的多样性极高, 但纯培养的种类却极少, 严重影响了氨氧化微生物生理生态学研究。单细胞测序技术使获得环境样品中未分离培养的微生物全基因组信息成为可能; 宏基因组和宏转录组测序技术可以从环境样品中获得大量序列信息, 结合蛋白质学研究能更好地推断氨氧化微生物的功能和环境适应性; 两者在环境氨氧化微生物中应用将从一定程度上减轻培养困难对功能研究造成的困扰。另外, 高分辨率的二次离子质谱分析技术为原位研究好氧氨氧化微生物代谢途径提供了有效手段。用微包埋培养取代传统培养方法^[72], 将为氨氧化微生物培养提供更有利的条件。

参考文献

[1] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea[J]. Science,

- 2004, 304(5667): 66-74
- [2] Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon[J]. Nature, 2005, 437(7058): 543-546
- [3] Cao HL, Hong YG, Li M, et al. Community shift of ammonia-oxidizing bacteria along an anthropogenic pollution gradient from the Pearl River Delta to the South China Sea[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(1): 247-259
- [4] Hou J, Song CL, Cao XY, et al. Shifts between ammonia-oxidizing bacteria and archaea in relation to nitrification potential across trophic gradients in two large Chinese lakes (Lake Taihu and Lake Chaohu)[J]. Water Research, 2013, 47(7): 2285-2296
- [5] Verhamme DT, Prosser JI, Nicol GW. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms[J]. The ISME Journal, 2011, 5(6): 1067-1071
- [6] Jin T, Zhang T, Yan QM. Characterization and quantification of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) in a nitrogen-removing reactor using T-RFLP and qPCR[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(3): 1167-1176
- [7] Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, et al. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(3): 245-252
- [8] Jung MY, Park SJ, Min D, et al. Enrichment and characterization of an autotrophic ammonia-oxidizing archaeon of mesophilic Crenarchaeal Group I. 1 α from an agricultural soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(24): 8635-8647
- [9] French E, Kozłowski JA, Mukherjee M, et al. Ecophysiological characterization of ammonia-oxidizing archaea and bacteria from freshwater[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5773-5780
- [10] Jung MY, Park SJ, Kim SJ, et al. A mesophilic, autotrophic, ammonia-oxidizing archaeon of Thaumarchaeal group I. 1 α cultivated from a deep oligotrophic soil horizon[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(12): 3645-3655
- [11] Lebedeva EV, Hatzepichler R, Pelletier E, et al. Enrichment and genome sequence of the group I. 1 α ammonia-oxidizing Archaeon “*Ca. Nitrosotenuis uzonensis*” representing a clade globally distributed in thermal habitats[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80835
- [12] Hatzepichler R, Lebedeva EV, Spieck E, et al. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(6): 2134-2139
- [13] Stieglmeier M, Klingl A, Alves RJ, et al. *Nitrososphaera viennensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic,

- ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum Thaumarchaeota[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt8): 2738-2752
- [14] de la Torre JR, Walker CB, Ingalls AE, et al. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(3): 810-818
- [15] Lehtovirta-Morley LE, 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
- [16] Pester M, Rattei T, Flechl S, et al. *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(2): 525-539
- [17] Purkhold U, Wagner M, Timmermann G, et al. 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(5): 1485-1494
- [18] Avrahami S, Conrad R. Patterns of community change among ammonia oxidizers in meadow soils upon long-term incubation at different temperatures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 6152-6164
- [19] Dang HY, Li J, Chen RP, et al. Diversity, abundance, and spatial distribution of sediment ammonia-oxidizing *Betaproteobacteria* in response to environmental gradients and coastal eutrophication in Jiaozhou Bay, China[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(14): 4691-4702
- [20] Yao HY, Campbell CD, Chapman SJ, et al. Multi-factorial drivers of ammonia oxidizer communities: evidence from a national soil survey[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(9): 2545-2556
- [21] Shen JP, Zhang LM, Di HJ, et al. A review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chinese soils[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 296
- [22] Kozłowski JA, Price J, Stein LY. Revision of N₂O-producing pathways in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(16): 4930-4935
- [23] Mehrotra PV, Brunson K, Hooper A, et al. Expression of two *Nitrosomonas europaea* proteins, hydroxylamine oxidoreductase and Ne0961, in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the South Dakota Academy of Science*, 2012, 91: 145-157
- [24] Dong NM, Risgaard-Petersen N, Sørensen J, et al. Rapid and sensitive *Nitrosomonas europaea* biosensor assay for quantification of bioavailable ammonium *sensu strictu* in soil[J]. *Environmental Science and Technology*, 2011, 45(3): 1048-1054
- [25] Ward BB, O'mullan GD. Worldwide distribution of *Nitrosococcus oceani*, a marine ammonia-oxidizing γ -proteobacterium, detected by PCR and sequencing of 16S rRNA and *amoA* genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 4153-4157
- [26] Urakawa H, Garcia JC, Nielsen JL, et al. *Nitrosospira lacus* sp. nov., a psychrotolerant, ammonia-oxidizing bacterium from sandy lake sediment[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(Pt1): 242-250
- [27] Guo JH, Peng YZ, Wang SY, et al. Pathways and organisms involved in ammonia oxidation and nitrous oxide emission[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2013, 43(21): 2213-2296
- [28] Hatzenpichler R. Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(21): 7501-7510
- [29] Martens-Habbena W, Berube PM, Urakawa H, et al. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria[J]. *Nature*, 2009, 461(7266): 976-979
- [30] Horak REA, Qin W, Schauer AJ, et al. Ammonia oxidation kinetics and temperature sensitivity of a natural marine community dominated by archaea[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(10): 2023-2033
- [31] Newell SE, Fawcett SE, Ward BB. Depth distribution of ammonia oxidation rates and ammonia-oxidizer community composition in the Sargasso Sea[J]. *Limnology and Oceanography*, 2013, 58(4): 1491-1500
- [32] Di HJ, Cameron KC, Shen JP, et al. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils[J]. *Nature Geoscience*, 2009, 2(9): 621-624
- [33] Beman JM, Popp BN, Francis CA. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California[J]. *The ISME Journal*, 2008, 2(4): 429-441
- [34] Dang HY, Zhou HX, Yang JY, et al. Thaumarchaeotal signature gene distribution in sediments of the northern South China Sea: an indicator of the metabolic intersection of the marine carbon, nitrogen, and phosphorus cycles?[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(7): 2137-2147
- [35] Sintez E, Bergauer K, de Corte D, et al. Archaeal *amoA* gene diversity points to distinct biogeography of ammonia-oxidizing *Crenarchaeota* in the ocean[J]. *Environment Microbiology*, 2013, 15(5): 1647-1658
- [36] Hou MH, Xiong JB, Wang K, et al. Communities of sediment ammonia-oxidizing bacteria along a coastal pollution gradient in the East China Sea[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 86(1/2): 147-153
- [37] Zheng YL, Hou LJ, Newell S, et al. Community dynamics and activity of ammonia-oxidizing prokaryotes in intertidal sediments of the Yangtze Estuary[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(1): 408-419
- [38] Fierer N, Carney KM, Horner-Devine MC, et al. The biogeography of ammonia-oxidizing bacterial communities in soil[J]. *Microbial Ecology*, 2009, 58(2): 435-445
- [39] Dodsworth JA, Hungate BA, Hedlund BP. Ammonia oxidation, denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in two US Great Basin hot springs with abundant ammonia-oxidizing archaea[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(8): 2371-2386
- [40] Peng X, Jayakumar A, Ward BB. Community composition of ammonia-oxidizing archaea from surface and anoxic depths of oceanic oxygen minimum zones[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 177
- [41] Liu JW, Yu SL, Zhao MX, et al. Shifts in archaeoplankton community structure along ecological gradients of Pearl Estuary[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 90(2): 424-435
- [42] Han MQ, Li ZY, Zhang FL. The ammonia oxidizing and denitrifying prokaryotes associated with sponges from different sea areas[J]. *Microbial Ecology*, 2013, 66(2): 427-436
- [43] Abell G CJ, Banks J, Ross DJ, et al. Effects of estuarine sediment hypoxia on nitrogen fluxes and ammonia oxidizer gene transcription[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 75(1): 111-122
- [44] Leininger S, Urich T, Schloter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. *Nature*, 2006, 442(7104): 806-809
- [45] Wang Y, Zhu GB, Ye L, et al. Spatial distribution of archaeal and bacterial ammonia oxidizers in the littoral buffer zone of a nitrogen-rich lake[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(5): 790-799
- [46] Zhao DY, Zeng J, Wan WH, et al. Vertical distribution of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in sediments of a Eutrophic Lake[J]. *Current Microbiology*, 2013, 67(3): 327-332
- [47] Molina V, Belmar L, Ulloa O. High diversity of ammonia-oxidizing archaea in permanent and seasonal oxygen-deficient waters of the eastern South Pacific[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(9): 2450-2465

- [48] Park BJ, Park SJ, Yoon DN, et al. Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in coculture with sulfur-oxidizing bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(22): 7575-7587
- [49] Martens-Habbena W, Stahl DA. Nitrogen metabolism and kinetics of ammonia-oxidizing archaea[J]. *Methods in Enzymology*, 2011, 496: 465-487
- [50] 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
- [51] Schmidt CS, Hultman KA, Robinson D, et al. PCR profiling of ammonia-oxidizer communities in acidic soils subjected to nitrogen and sulphur deposition[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 61(2): 305-316
- [52] Huang R, Wu YC, Zhang JB, et al. Nitrification activity and putative ammonia-oxidizing archaea in acidic red soils[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2012, 12(3): 420-428
- [53] Wang BZ, 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
- [54] He JZ, Shen JP, Zhang LM, 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[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9): 2364-2374
- [55] Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, et al. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1601-1611
- [56] Gubry-Rangin C, Nicol GW, Prosser JI. Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 74(3): 566-574
- [57] Zhang LM, Hu HW, Shen JP, 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
- [58] Liu JW, Liu XS, Wang M, et al. Bacterial and archaeal communities in sediments of the North Chinese Marginal Seas[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 70(1): 105-117
- [59] Vajjala N, Martens-Habbena W, Sayavedra-Soto LA, et al. Hydroxylamine as an intermediate in ammonia oxidation by globally abundant marine archaea[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(3): 1006-1011
- [60] Walker CB, de la Torre JR, Klotz MG, et al. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(19): 8818-8823
- [61] Blainey PC, Mosier AC, Potanina A, et al. Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16626
- [62] Pérez J. Transcriptome profiling of *Nitrosomonas europaea* grown singly and in co-culture with *Nitrobacter winogradskyi*[D]. Corvallis: Master's Thesis of Oregon State University, 2014
- [63] Tourna M, Stieglmeier M, Spang A, et al. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(20): 8420-8425
- [64] Könneke M, Schubert DM, Brown PC, et al. Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO₂ fixation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(22): 8239-8244
- [65] Chain P, Lamerdin J, Larimer F, et al. Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(21): 6496-6496
- [66] Schreiber F, Wunderlin P, Udert KM, et al. Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: biological pathways, chemical reactions, and novel technologies[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 372
- [67] Goreau TJ, Kaplan WA, Wofsy SC, et al. Production of NO₂⁻ and N₂O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 40(3): 526-532
- [68] Löscher CR, Kock A, Könneke M, et al. Production of oceanic nitrous oxide by ammonia-oxidizing archaea[J]. *Biogeosciences*, 2012, 9(7): 2419-2429
- [69] Jung MY, Well R, Min D, et al. Isotopic signatures of N₂O produced by ammonia-oxidizing archaea from soils[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(5): 1115-1125
- [70] Stieglmeier M, Mooshammer M, Kitzler B, et al. Aerobic nitrous oxide production through N-nitrosating hybrid formation in ammonia-oxidizing archaea[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(5): 1135-1146
- [71] Monteiro M, Séneca J, Magalhães C. The history of aerobic ammonia oxidizers: from the first discoveries to today[J]. *Journal of Microbiology*, 2014, 52(7): 537-547
- [72] Ji SQ, Liu CG, Zhang XH. The progress and applications of microencapsulation and cultivation of marine microorganisms[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, 40(4): 53-59 (in Chinese)
- 冀世奇, 刘晨光, 张晓华. 海洋微生物微包埋培养及应用研究进展[J]. *中国海洋大学学报*, 2010, 40(4): 53-59