

土壤氨化过程中微生物作用研究进展*

赵彤¹ 蒋跃利¹ 闫浩¹ 黄懿梅^{1, 2**}

¹西北农林科技大学资源环境学院, 农业部西北植物营养与农业环境重点实验室 杨凌 712100

²西北农林科技大学黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室 杨凌 712100

摘要 土壤氮素矿化产生的无机氮是植物的主要氮素来源, 土壤氨化过程是氮素矿化的第一步, 微生物在其中发挥着巨大作用. 本文从氨化过程的微生物作用机理, 可利用碳氮比、蛋白酶和微生物群落结构等影响因素以及微生物研究方法3个方面来讨论微生物对氨化过程的重要贡献. 研究发现高分子可溶性有机氮的解聚作用很可能是氨化过程的限速步骤, 土壤微生物生物量氮有可能是微生物易利用氮的直接且主要来源, 同时土壤可利用碳氮比对氨态氮的产生具有重要影响. 最后介绍了分子生物学新方法尤其是高通量测序技术在土壤微生物作用研究中的应用, 并就目前未解决问题和今后研究方向提出展望. 图1 参63

关键词 氨化过程; 氨化微生物; 碳氮比; 限速步骤; 高通量测序

CLC S154.34

Research advances on microbial function in soil ammonifying process*

ZHAO Tong¹, JIANG Yue¹, YAN Hao¹ & HUANG Yimei^{1, 2**}

¹ College of Natural Resource and Environment, Key Laboratory of Plant Nutrition and Agri-environment of Northwest China, Ministry of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

² State Key Laboratory of Soil Erosion and Dry Land Farming on Loess Plateau, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract Inorganic nitrogen which comes from soil nitrogen mineralization is the main nitrogen source for plant. Ammonifying process is the first step of nitrogen mineralization, in which microbes play an important role. This paper discussed the effects of microbes in ammonifying process from three aspects: the microbial action mechanism of degrading soil organic nitrogen into ammonia, the influencing factors including available carbon to nitrogen ratio, protease and microbial community structure, and some latest techniques for microbial research. Some researches found that the depolymerization of high molecular weight soluble organic nitrogen is likely the rate-limiting step in ammonifying process; soil microbial biomass nitrogen may be the direct and main source of microbial available organic nitrogen; at the same time, soil available carbon to nitrogen ratio has a significant effect on the production of ammonium. In the end, we introduced some new molecular biology techniques, especially high-throughput sequencing for research of soil microbes, and suggested the unsolved problems and possible future research direction.

Keywords ammonifying process; ammonifier; carbon to nitrogen ratio; rate-limiting step; high-throughput sequencing

土壤中植物可利用氮素是植物生长的最大限制性营养元素, 自然条件下土壤氨化过程(有机氮转化为铵态氮的过程)是铵态氮的主要来源, 随后部分铵态氮参与硝化过程生成硝态氮, 两者成为植物可利用氮素的主要来源. 氨化过程是氮素矿化(有机氮转化为铵态氮、硝态氮过程)的第一步, 也是植物可利用氮素供应的关键一步. 传统氨化过程研究从宏观上得到了不同土壤及处理下铵态氮的释放规

律, 但由于氨化过程基本是土壤微生物作用的结果, 因此从氨化微生物生长代谢和微生物群落等角度研究其作用机理, 才能从本质上解释土壤中铵态氮的变化规律. 近年来, 随着分子生物化学领域中微生物多样性分析、功能基因鉴定蛋白表达技术的成熟和宏观基因组学的发展, 有关土壤微生物氨化过程的本质正在被逐渐揭示. 本文对土壤氨化过程的微生物机理、影响因素和新研究方法3个方面进行综述, 并对目前存在的问题和今后发展方向提出展望.

1 土壤氨化过程的微生物机理

参与氨化过程的最初天然有机氮大分子以蛋白质为主, 其在微生物细胞外物理、化学、生物作用(胞外酶)下变性、解聚生成多肽, 接着在多种肽酶作用下断裂肽键形成二肽、氨基酸, 微生物可以直接吸收氨基酸并同化, 多余氮素将以氨态氮形式排出体外. 土壤氨化过程新旧两种模式如图1所示.

1.1 微生物细胞外含氮有机物的降解

土壤有机氮占全氮的95%以上^[1], 而微生物可直接吸

收稿日期 Received: 2013-08-13 接受日期 Accepted: 2013-10-09

*国家自然科学基金重点项目(41101254)、西北农林科技大学基本科研基金项目(QN2011020)和黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室开放基金(K318009902-1321)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (41101254), the Basic Scientific Research Foundation of Northwest A&F University (QN2011020), the Open Fund of State Key Laboratory of Soil Erosion and Dry Land Farming on Loess Plateau (K318009902-1321).

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: ymhuang1971@nwsuaf.edu.cn)

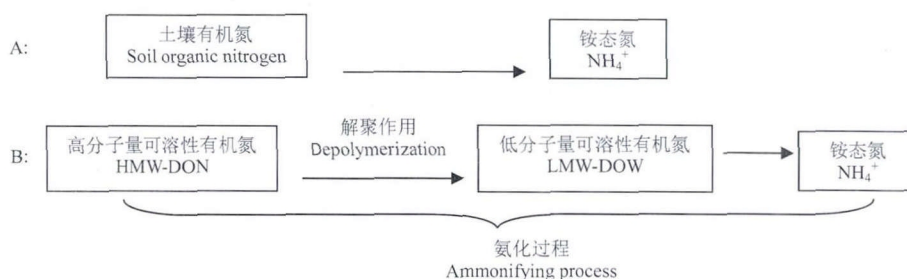


图1 土壤有机氮氮化过程的传统模式(A)与20世纪90年代中后期的新模式(B)。

Fig. 1 Traditional paradigm (A) and the new paradigm in late 1990s (B) of soil organic nitrogen ammonifying process.

收利用氮不足5%，很多天然有机氮大分子较难降解，易被微生物降解吸收的主要是低分子量可溶性有机氮(Low molecular weight dissolved organic nitrogen, LMW-DON)。近来研究发现，高分子量可溶性有机氮(High molecular weight dissolved organic nitrogen, HMW-DON)在胞外酶作用下转变为LMW-DON的过程很可能是氮化过程的限速步骤^[2-4]。

HMW-DON主要包括腐殖质类、蛋白质等高分子物质，占DON的比例超过75%^[2]，且50%以上未知，LMW-DON主要是氨基酸、氨基糖、核苷酸类，占可溶性有机氮(Dissolved organic nitrogen, DON)5%以下，但相对于HMW-DON来说，极易被微生物吸收利用^[5]，并且不同氨基酸的吸收几乎无差异^[6]。Jones等研究发现，总自由氨基酸、铵态氮在土壤中的浓度很低，而DON相对较高，说明前者不是氮化速率的限制因素，他们推测蛋白、多肽类物质向氨基酸的转化过程可能是主要限制因素^[2]，他们还发现，外源添加的高分子量蛋白(或多肽化合物)向铵态氮的转化速率要低于LMW-DON(如氨基酸、二肽、三肽化合物)向铵态氮的转化，这间接说明HMW-DON向LMW-DON的转化可能是氮化过程的限速步骤^[5]。David发现北美黑云杉植被土壤中DON主要是有机氮，无机氮含量很低，他指出该土壤中铵态氮的产生受蛋白向氨基酸的转化影响更大，而非氨基酸向铵态氮的转化，前者是氮可利用性的主要限制因子^[4]。Schimel指出，HMW-DON到LMW-DON的解聚作用是控制新的可利用氮向生态系统持续流动和氮素循环的关键步骤，一旦氮素进入LMW-DON，它将在微生物系统中不断被循环利用^[3]。

现在研究者已达成共识，承认土壤中氮化过程基本上是一系列酶作用的过程^[7]，因而HMW-DON降解的过程必然是以酶催化为主。研究发现不同酶对氮化过程的贡献不同^[8-10]，Schimel指出真菌能够跨越土壤微区域(Microsites)并分泌解聚含氮化合物的胞外酶，很可能对高分子解聚有重要贡献^[3]。Paul等指出蛋白酶对土壤生物可利用氮贡献最大^[3]，蛋白酶主要来源于真菌的半胱氨酸、天冬氨酸蛋白酶，细菌的丝氨酸蛋白酶、碱性和中性金属蛋白酶^[11]。Zaman等发现，微生物活性和胞外酶活性随外源奶牛棚废水的添加而立刻增加，与氮化速率呈线性关系，并指出蛋白酶有潜力作为氮化作用的一个指示变量^[12]。

部分LMW-DON可作为氨基酸脱氨酶目标物在胞外进行脱氨作用释放铵态氮^[12]，例如精氨酸脱氨酶、L-组氨酸脱氨酶可以将对应底物脱氨基并释放铵态氮，可以用来表

征土壤氮化作用潜力^[13-14]，研究者还发现1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)脱氨酶能在胞外将植物催熟剂乙烯的前体ACC脱氨降解，抑制乙烯的产生，同时产生铵态氮^[15]。

1.2 微生物细胞内代谢产铵态氮

当LMW-DON如氨基酸进入细胞后，首先经转氨基作用将氨基转移到 α -酮戊二酸上生成谷氨酸，再由其经转氨酶作用生成其他氨基酸并进而形成蛋白，当细胞内碳水化合物产能不足时，前面转氨作用生成的另一产物有机酸与酮戊二酸结合生成丙酮酸，丙酮酸参与细胞内的三羧酸循环，最终释放能量。当有机氮供应超过微生物生长代谢所需时，即转氨基作用产生的中间产物氨基态氮过量时，解聚作用和脱氨基作用被启动，氨基将以铵离子形式被排出体外^[16]。因此，微生物胞内释放的氮主要是碳不足时启动有机氮供能的废物。早期脱氨反应研究以动物细胞为主，有关微生物细胞内脱氨反应及催化酶的研究较少，现已知L-氨基酸氧化酶(L-amino acid oxidase, LAO)能够催化L-氨基酸的 α -氨基氧化脱氨生成铵态氮，许多细菌、真菌都能表达LAO并且LAO具有较广的底物特异性，Jaro发现它也是粘滑菇属(*Hebeloma*)和双色蜡蘑(*Laccaria bicolor*)这两类真菌细胞氨基酸分解代谢的一种机制，并指出LAO有潜力作为评价生态系统水平下催化氨基酸氮化作用机制的一个候选指标^[17]。

另外，厌氧条件下反硝化细菌细胞内硝态氮可以作为电子受体进行能量代谢，同时生成铵态氮排除体外^[18]。

2 土壤氮化过程的影响因素

微生物可降解有机氮是土壤铵态氮的直接来源，影响微生物生长代谢的各种因素也同时影响着铵态氮的产生，而铵态氮的汇决定了其在土壤中的存在方式和数量。土壤中铵态氮的源和汇在时间空间上的变异共同决定了其分布特征。

2.1 氮化过程可利用氮的来源

前面已经提到，LMW-DON是微生物可直接吸收利用的有机氮，在自然生态系统中，这些有机氮主要来自于土壤中死亡的微生物、原生动物的根系分泌物。虽然每年会有大量的叶片等植物凋落物进入土壤，但纤维素作为其主要成分降解较为缓慢，而土壤微生物较短的生长周期和易降解性使人们逐渐开始重视其对土壤氮化过程的重要贡献。

Satti等发现土壤净氮矿化与土壤微生物生物量氮(Soil

microbial biomass nitrogen, SMBN) 呈线性关系^[19], Schneider认为死亡微生物体内的氨基酸态氮(蛋白、多肽)和氨基糖聚合物是可矿化氮的主要来源^[7], 氮素矿化培养中发现的干土效应被证明是由于死亡微生物细胞内多肽类物质的释放^[20]. 草原带微生物活性相对较高, 其周转非常快, Okano发现草原带被标记的SMBN在前60 d的半衰期为0.05年, 从第63天(d 63)到d 554降低为1.32年^[21]. 新形成的微生物细胞在死亡后会很快被降解再吸收, Marumoto等发现土壤干湿交替处理28 d后已降解的死亡微生物被固定后又有37%发生矿化, 总土壤有机氮矿化量的76%来源于添加的死亡微生物^[22], Holes等研究表明, 在土壤氮素的净矿化量呈明显季节变化的同时, 土壤微生物生物量(Soil microbial biomass, SMB)却相对稳定, 他推测土壤氮素有效性更取决于SMBN的转化率而非SMBN^[23]. 虽然SMBN总量很小, 但其转化的氮素远大于施入土壤的氮素, 也大于植物带走的氮素, 表明SMBN可以看做土壤养分的源和库^[24]. 概括来看, SMBN很有可能是自然生态系统中土壤氮化过程的主要氮素来源.

2.2 土壤可利用碳氮比

自然生态系统中植被种类的丰富度对土壤微生物群落组成具有重大影响, 并且控制着土壤氮素循环的关键过程, 较高的植物产量对氮素矿化具有促进作用^[25]. 土壤温度、湿度、团聚体组成、pH等物理化学因素通过影响微生物活性、分布和胞外酶活性从而影响氮化过程, 土壤温度的升高和频繁的干、湿交替, 将改变微生物群落组成并可能增加SMB和酶活性^[26-27]. 这里重点讨论可利用碳氮比、蛋白酶和微生物群落结构对氮化过程的影响.

国内一些研究指出可以用土壤有机碳和全氮的比例来表征氮素氮化作用潜力, 比值越低潜力越大, 但事实上, 土壤有机碳和全氮的大部分组分较为稳定难分解, 只有其中微生物易利用的部分才对氮化过程起直接作用, 许多研究已表明, 土壤中微生物易利用有机碳、氮的比例控制着氮转化的方向和速率.

Alef等早期研究发现, 当土壤中添加大量精氨酸后, 铵态氮在几小时内呈直线上升, 但微生物量及其生理特性却没改变, 说明氨基酸类低碳氮比物质促进铵态氮产生^[28]. Mengel进而指出, 在蛋白等含量高时, 可利用性有机碳相对成为微生物生长的限制因素, 因此胞外蛋白降解产生的氨基酸被用作产能而消耗^[7]. Bettina在研究中也指出, 外源添加的DON的生物降解是由微生物对碳而非氮的需求所驱动的, 排出的铵态氮是DON产能废物^[29]. 当土壤中可利用碳氮比较高时, 氮化作用被抑制. Stark等发现在添加有机质后, 矿质态氮在60 d后才显现, 他解释这是由于碳氮比相对较高, 碳素被不断消耗, 到后期氮素才相对剩余^[9]. Daniel等指出, 土壤中添加的葡萄糖会抑制蛋白酶活性, 微生物会首先利用葡萄糖作为产能底物而非有机氮^[30]. 这些都可以看做是激发效应(Priming effect)(土壤中适度添加的物质处理导致土壤物质强烈的短期变化)的表现, 外源添加碳素、氮素改变了微生物可利用碳、氮, 从而导致微生物数量、活性及代谢途径的改变, 进而使土壤氮素氮化过程发生或延迟^[31].

2.3 土壤蛋白酶及微生物群落

前面已指出, HMW-DON到LMW-DON是氮素氮化作用的限速步骤, 这一过程中需要许多酶的共同分工作用^[32], 蛋白酶很可能是氮化过程限速步骤中的关键酶, 而某些微生物类群对这一过程有着重要作用.

细菌是降解新鲜植物凋落物和死亡微生物残体的第一批微生物, 它们分泌的蛋白酶中以碱性和中性金属蛋白酶催化的反应类型最多. Asmar用¹⁵N标记易降解有机氮, 发现胞外蛋白酶活性和净氮溶解速率高度相关, 这似乎说明以蛋白酶表征的胞外酶活性是土壤有机氮溶解的一个限制因素^[33]. Daniela研究发现, 距离城市较远的热带森林土壤中总矿化氮和总可溶性氮与酶活性呈正相关关系^[34]. Michihiko等指出, 不同蛋白水解细菌释放不同数量和活性的蛋白酶, 该类菌群的组成在土壤总蛋白酶活性方面扮演重要角色^[9]. Bath等用传统方法发现荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、蜡状芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)、蕈状芽胞杆菌(*B. mycoides*)、噬细胞菌属(*Cytophaga*)和黄杆菌属(*Flavobacterium*)是许多土壤中的主导蛋白水解细菌, 它们都分泌金属蛋白酶^[35]. Watanabe等发现芽胞杆菌属分泌的肽酶, 尤其是蜡状芽胞杆菌和蕈状芽胞杆菌分泌的中性金属肽酶以及枯草杆菌(*B. subtilis*)分泌的碱性丝氨酸蛋白酶可能是稻田土壤中控制多肽降解的主要蛋白酶^[36]. 虽然土壤中真菌数量比细菌低好几个数量级, 而且需要较为稳定的生存环境, 但它们较大的表面积有助于土壤颗粒微区域间物质的转运, 其中部分能分泌解聚含氮化合物的胞外酶(主要是蛋白酶)^[3]. Nygren等研究发现蛤蟆蕈(*Amanita muscaria*)、短孢黄绿红菇(*Russula chloroides*)、乳菇属(*Lactarius*)等外生菌根真菌均具有蛋白酶酶谱, 说明分泌胞外蛋白酶是其普遍生理特性^[37].

土壤中不同功能微生物群落数量、比例的不同能在一定程度上反映该功能强度的不同. 周巧红等发现人工湿地中氮化细菌在6月、9月数量明显高于其他月份, 且相对于硝化、反硝化、纤维素分解菌成为优势功能菌, 说明温度对该类功能微生物的比例具有重要影响^[38]. Antonie指出, 对于种群组成和数量较大的群落来说, 其受外界扰动的影响很小, 某种菌活性下降的同时另一种菌活性会上升用于保持功能平衡, 他用分离纯培养的方法发现68株细菌对41种单一有机碳源的利用没有特异性, 推测可以用氮化微生物群落的多样性来解释水体中可溶性氨基酸保持低浓度恒定不变的现象^[39]. Donald等发现随着植物多样性的增加, 土壤中真菌丰度明显增加, 氮素矿化速率也明显增加, 说明微生物群落结构中真菌所占比例对氮素矿化的重要贡献^[25].

2.4 氨态氮的汇

自然生态系统中, 土壤铵态氮的主要汇包括微生物吸收、植物吸收和土壤颗粒(主要是粘土矿物)吸附, 其中以硝化细菌吸收转化为主. 当土壤中铵态氮较高时, 会促进硝化过程进行并被硝化细菌吸收转化为硝态氮而积累下来^[2, 40], Stephanie等向土壤中添加抗生素以抑制微生物的蛋白合成, 结果发现微生物对DON的利用由同化转化为氮化, 并且铵态氮的主要汇是自养硝化细菌^[41]. 土壤氮素氮化过程很大程度上因硝化过程而被低估.

3 土壤氮化过程中微生物作用的研究方法

3.1 宏观研究方法

早期由于技术限制,微生物在氮化过程中的作用主要以测定氮化细菌数量、氮化作用强度和 Related 胞外酶(如蛋白酶、脱氨酶)活性为主^[14, 28, 33],但是土壤中可分离培养得到的细菌不到总细菌的1%,严重限制了对总氮化细菌数量的估计,氮化作用强度和酶活性是通过添加底物测定其潜力,并不能反映土壤的实际水平.也有从单株氮化微生物对不同碳源、氮源利用,最适温度、pH等方面研究其对有机氮的分解、蛋白酶活性和产氨作用大小^[42-45],但在自然土壤中,氮化过程是在一定范围空间内由许多微生物共同完成,单株菌的研究结果很可能不太适用于实际土壤.因此,研究土壤中氮化微生物群落水平下的氮化过程变得很有必要,而分子生物学技术的发展应用为该研究提供了可能.同时应用同位素示踪技术可以通过跟踪氮素在底物、微生物和产物之间的转移过程来理解微生物在氮化过程中的作用及贡献大小^[22, 41, 46-47].

3.2 微观研究方法

3.2.1 微生物群落多样性研究 由于土壤中微生物种类庞大,单一微生物种属并不能代表该类微生物对氮素氮化的贡献,前面已指出在微生物种群丰度高的环境中某一菌群减少的同时会有其他菌群代替其作用,该功能微生物种群保持相对稳定^[48],因此研究土壤中该类微生物群落分布随环境、时间的变化更能反映其对氮化过程的贡献.其中,磷脂脂肪酸(Phospholipid fatty acid, PLFA)技术可以研究活的微生物数量和不同微生物类群分布,Boyle用该方法研究土壤添加抗生素后微生物群落的变化,发现该处理使细菌、真菌的氮化作用明显增强,并指出森林生态系统中异养细菌和真菌可能主要以有机氮合成自身物质^[41].变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术可以判定含目的基因的微生物群落结构及个体相对含量.末端限制性片段长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)技术通过限制性酶切得到限制性片段从而判定含目的基因的微生物种类多样性^[49],但这几种方法受研究精度、深度的限制,不能全面反映土壤中微生物多样性的分布,土壤中数以万计的微生物种类使系统研究土壤中功能微生物群落的分布、变化需要更加庞大的数据支持,而宏基因组学(Metagenomic)概念的提出使人们能够从总基因组角度更加全面地研究土壤微生物的分布^[50],Petersen等发现总细菌16SrRNA丰富度与总矿化速率间具有紧密联系^[50].

伴随2005年高通量测序技术(以Roche公司的454为主)的出现,有关宏基因组学的研究真正向前迈出了一大步,它克服了传统Sanger技术的低速率和高成本缺点,利用酶级联化学发光反应,能够在较短时间内得到上百万个基因组信息^[51],再用生物信息学方法分析海量数据,判断微生物多样性组成,并结合已知的功能基因序列预测该功能作用的潜力,它为环境中微生物的宏观研究提供了广阔平台和发展前景.Roesch等采用454测序法研究西半球的一个大的横断面的

4类土壤,发现最丰富的微生物类群属于拟杆菌纲、 β -变形菌纲和 α -变形菌纲,与农业土壤相比,森林土壤的微生物多样性更为丰富,然而检测结果表明森林土壤中的古生菌多样性较少,仅为该位点所有序列的0.009%,而农业土壤的比例则为4%-12%^[52].Chu等用454高通量测序发现北极的微生物群落与其他地区的微生物群落没有本质不同,而土壤pH值是决定微生物群落分布的最主要因素,空间距离不能很好地预测土壤微生物多样性差异^[53].

3.2.2 相关功能基因研究 氮化过程最终由微生物功能基因控制,包括相关胞外酶基因和胞内脱氨酶基因等.蛋白酶在土壤氮素氮化过程中的重要贡献已得到充分肯定,而部分蛋白酶基因已经找到,包括细菌的碱性金属肽酶*apr*、中性金属肽酶*npr*、丝氨酸肽酶*sub*等^[54],真菌如泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)的天冬氨酸蛋白酶*pepA*,米曲霉(*A. oryzae*)的碱性蛋白酶*alp*,烟曲霉(*A. fumigatus*)的金属蛋白酶*mep*等^[55].Southern-blot探针杂交技术可以检验所提取基因中是否含有目的基因,Bach用该方法分别检验了52种已有纯细菌中*apr*、*npr*和*sub*基因的分布,发现*sub*和*npr*基因主要存在于多种芽孢杆菌属(*Bacillus*)中,*apr*仅存在于荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)中,他进一步用5种细菌的*sub*、7种细菌的*apr*和13种细菌的*npr*基因分别合成简并引物,扩增得到土壤微生物总DNA的目的片段,说明这3种简并引物的有效性^[54].Sakurai利用该简并引物扩增得到的目的片段做DGGE分析,发现土壤中添加有机肥、无机肥对含*apr*、*npr*基因的细菌群落影响很大^[56].Fuka等利用61个*npr*基因序列设计了简并引物,通过T-RFLP分析揭示了含*npr*基因的细菌群落结构随季节的明显变化,他指出其研究区域内存在非典型*npr*基因编码的蛋白水解细菌^[49].但功能基因片段的相对数量只能预测对应蛋白的可能表达,而mRNA能确定该基因片段是否表达,定量PCR(Quantitative-PCR, Q-PCR)技术通过定量检测mRNA的反转录产物cDNA,确定目的基因的表达程度,Dorthe等就用Q-PCR研究了土壤中硝化、反硝化过程对应功能基因的丰富度变化,指出功能基因丰富度是预测土壤中特定功能过程潜在速率的最重要变量^[50].

微生物在长期进化过程中基因不断发生突变,有关目的基因定性、定量分析方法的局限性愈发明显,而高通量测序技术不断延伸的可读取碱基片段长度,使从已有的海量微生物基因数据直接研究某一已知功能基因存在与否成为可能,并且将高通量测序技术进一步与其他分子生物学技术结合起来,能够充分发挥两者的优势^[51],以下介绍3种相关技术:

(1)宏转录组(Metatranscriptome)指特定环境下群体细胞转录的所有RNA(包括mRNA和非编码RNA)的类型及拷贝数,利用宏转录组高通量测序所研究的是微生物正在进行的代谢过程,能够更好地反映微生物代谢作用的强弱,Yu等利用Illumina Hi-seq2000测定活性污泥中的微生物宏基因组和宏转录组,发现反硝化功能基因(*har*, *nar*, *nor*, *nir*, *nos*)在总DNA和cDNA水平上占绝对优势(分别为78.57%、76.75%),但cDNA/DNA仅0.03,而氨单加氧酶基因(*amoA*, *amoB*, *amoC*)和羟胺氧化酶基因(*hao*)的cDNA/DNA高达0.18,说明环境中硝化作用较强^[57].Zakrzewsk等使用GS FLX

+系统(Roche 454升级版)对生物沼气池样品进行宏转录组高通量测序,通过mRNA序列比对数据库,发现有编码水解酶、酸化酶、醋酸化酶和产甲烷酶的基因片段,进而构建产甲烷菌群的代谢途径,并认为可以利用对微生物群落的监控达到对生产过程中的沼气关键代谢的监控^[58]。

(2)最近诞生的染色质免疫共沉淀测序(Chromatin immune precipitation sequencing, Chip Seq)技术充分结合了Chip和高通量测序技术的优势,能够在全基因组范围内高效地研究与组蛋白或转录因子等互作的DNA区段信息^[51],Wang等在体细胞胚胎发生的研究中发现了一个PGA 37基因,该基因编码一个R2R3 MYB转录因子,在植物体细胞胚胎发生和脂肪酸生物合成过程中起着重要的调控作用,他指出分离并鉴定PGA 37的靶基因是阐明该基因生物学功能的关键^[59]。

(3)基因芯片(Geo chip)技术利用单芯片上覆盖的大量寡核苷酸探针(Geo chip 4.0包含了超过152 000个基因的寡聚核苷酸探针,涵盖了410个功能区组的84 000个基因),能够快速、准确、定量检测样品中的目的基因,是了解环境微生物功能基因的极有力工具^[60]。Zhou等基于功能基因芯片的长期增温实验表明,土壤微生物群落结构在增温条件下发生了显著改变,分解易降解碳的基因变得活跃,而分解难降解碳的基因并没有显著改变,这就保证了土壤碳存储的相对稳定^[61]。He等发现CO₂浓度升高刺激了调节重要物质循环过程基因的活性,其中碳固定基因、易降解碳基因以及氮循环基因的数量明显增多^[62]。但基因芯片技术具有只针对已知基因的限制性,而高通量测序数据经过软件分析后,能够发现许多潜在功能基因。

以上新方法通过找到环境中大量已知和未知功能基因的丰度变化,能够从宏观上把握环境微生物的分布及其变化规律,再结合蛋白-基因组学(Proteogenomic)将功能基因和其表达蛋白结合起来研究,能够从真正意义上评价功能基因的最终作用^[63]。

4 存在问题及展望

虽然微生物在土壤氮化过程中的关键作用不断得到认同,相关过程机理也在不断揭示,但仍有许多问题有待解决。由于氮化过程定义中的有机氮过于概括,同时大多数微生物能够利用LMW-DON产氮,这使得氮化过程研究范围过广而失去针对性,HMW-DON向LMW-DON降解是氮化过程的限速步骤,因此确定易降解HMW-DON的主要来源和成分,寻找关键胞外酶和主要氮化微生物类群以及研究HMW-DON解聚过程是未来研究的重点所在;确定LMW-DON的转化周期、胞外有机物脱氮和胞内代谢产氮的相对大小能够明确其对氨态氮产生速率的贡献;研究土壤氮化过程中氮化微生物的动态变化能够使我们从微生物群落角度更好地理解氮化过程的生态学机制及其对氮素循环的贡献;寻找胞内胞外相关产氮酶的一系列控制基因,从基因组学角度研究氮化微生物能够使我们重新认识其进化关系。

新技术的发展和应用于未来土壤氮化过程研究提供了更完善的手段,同位素示踪技术、荧光标记技术可以追踪氮素在氮化过程中的全程转移,从而不断完善氮化过程的细节途径;分子生物学技术可以帮助我们最本质层面认

识土壤氮化过程的微生物作用机理,深入理解氮化过程的胞外胞内各个环节,找到更多具有氮化作用功能基因的微生物,进而从微生物群落角度宏观把握其对环境响应机制。随着氮化全过程机理被逐渐揭示,人们将更好地认识自然生态系统的氮素循环过程,并尽可能地为农田耕作、植被恢复和湿地保护等的土壤氮素利用提供理论支持。

参考文献 [References]

- 周志华,肖化云,刘丛强. 土壤氮素生物地球化学循环的研究现状与进展[J]. 地球与环境, 2004, 32(3-4): 21-26 [Zhou ZH, Xiao HY, Liu CQ. Research status and advances in biogeochemical cycling nitrogen in soils [J]. *Earth Environ*, 2004, 32(3-4): 21-26]
- Jones DL, Shannon D, Murphy DV, Farrar J. Role of dissolved organic nitrogen (DON) in soil N cycling in grassland soils [J]. *Soil Biol Biochem*, 2004, 36(5): 749-756
- Schimel JP, Bennett J. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm [J]. *Ecol Soc Am*, 2004, 85(3): 591-602
- David L, Jones KK. Soil amino acid turnover dominates the nitrogen flux in permafrost-dominated taiga forest soils [J]. *Soil Biol Biochem*, 2002, 34: 209-219
- Jones DL, Kielland K. Amino acid, peptide and protein mineralization dynamics in a taiga forest soil [J]. *Soil Biol Biochem*, 2012, 55: 60-69
- Roberts P, Stockdale R, Khalid M, Iqbal Z, Jones DL. Carbon-to-nitrogen ratio is a poor predictor of low molecular weight organic nitrogen mineralization in soil [J]. *Soil Biol Biochem*, 2009, 41(8): 1750-1752
- Mengel K. Turnover of organic nitrogen in soils and its availability to crops [J]. *Plant Soil*, 1996, 181: 83-93
- 钱佩源,吴豪森. 水稻土氮素矿化的微生物学活性研究[J]. 上海农学院学报, 1985, 3(1): 7-13 [Qian PY, Wu HS. Studies on microbiological activities of nitrogen mineralization in paddy soils [J]. *J Shanghai Agric Coll*, 1985, 3(1): 7-13]
- Stark CH, Condron LM, O'Callaghan M, Stewart A, Di HJ. Differences in soil enzyme activities, microbial community structure and short-term nitrogen mineralisation resulting from farm management history and organic matter amendments [J]. *Soil Biol Biochem*, 2008, 40(6): 1352-136
- Tian L, Dell E, Shi W. Chemical composition of dissolved organic matter in agroecosystems: correlations with soil enzyme activity and carbon and nitrogen mineralization [J]. *Appl Soil Ecol*, 2010, 46(3): 426-435
- Thomas M, Schmidt MS. Topics in Ecological and Environmental Microbiology [M]. New York: Academic Press, 2011
- Zaman M, Di HJ, Cameron KC, Frampton CM. Gross nitrogen mineralization and nitrification rates and their relationships to enzyme activities and the soil microbial biomass in soils treated with dairy shed effluent and ammonium fertilizer at different water potentials [J]. *Biol Fertil Soils*, 1999, 29: 178-186
- Singh DK, Kumar S. Nitrate reductase, arginine deaminase, urease and dehydrogenase activities in natural soil (ridges with forest) and in cotton soil after acetamiprid treatments [J]. *Chemosphere*, 2008, 71(3): 412-418
- Badaluco L, Kuikman PJ, Nannipieri P. Protease and deaminase activities in wheat rhizosphere and their relation to bacterial and protozoan populations [J]. *Biol Fertil Soils*, 1996, 23: 99-104

- 15 Shah S, Li JP, Moffatt BA, Glick BR. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria [J]. *Microbiol J Can*, 1998, **44**: 833-843
- 16 普雷斯科特. 微生物学[M]. 沈萍, 彭珍荣主译. 5版. 北京: 高等教育出版社, 2003
- 17 Nuutinen JT, Timonen S. Identification of nitrogen mineralization enzymes, L-amino acid oxidases, from the ectomycorrhizal fungi *Hebeloma* spp. and *Laccaria bicolor* [J]. *Brit Mycol Res*, 2008, **112**: 1453-1464
- 18 马迪根, 马丁克, 帕克. 微生物生物学[M]. 杨文博等译. 8版. 北京: 科学出版社, 2001
- 19 Satti P, Mazzarino MJ, Gobbi M, Funes F, Roselli L, Fernandez H. Soil N dynamics in relation to leaf litter quality and soil fertility in north-western Patagonian forests [J]. *J Ecol*, 2003, **91**: 173-181
- 20 沈其荣, 史瑞和. 土壤预处理对不同起源氮矿化的影响[J]. 南京农业大学学报, 1991, **14** (1): 54-58 [Shen QR, Shi RH. The effect of soil pretreatment on the mineralization of nitrogen deprived from different forms [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 1991, **14** (1): 54-58]
- 21 Okano S, Nishio M, Sawada Y. Turnover rate of soil biomass nitrogen in the root mat layer of pasture [J]. *Plant Nutr Soil Sci*, 1987, **33** (3): 373-386
- 22 Marumoto T, Anderson JPE, Domsch KH. Decomposition of 14 C- and 15 N-labelled microbial cells in soil [J]. *Soil Biol Biochem*, 1982, **14**: 461-467
- 23 Holes WE, Zak DR. Soil microbial biomass dynamics and net nitrogen mineralization in northern hardwood ecosystems [J]. *Soil Sci Soc Am*, 1994, **58**: 238-243
- 24 张成霞, 南志标. 土壤微生物生物量的研究进展[J]. 草业科学, 2010, **27** (6): 50-57 [Zhang CX, Nan ZB. Research progress of soil microbial biomass in China [J]. *Pratacul Sci*, 2010, **27** (6): 50-57]
- 25 Zak DR, Holmes WE, White DC, Peacock AD, Tilman D. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? [J] *Ecology*, 2003, **84** (4): 2042-2050
- 26 Henry HAL, Juarez JD, Field CB, Vitousek PM. Interactive effects of elevated CO₂, N deposition and climate change on extracellular enzyme activity and soil density fractionation in a California annual grassland [J]. *Global Change Biol*, 2005, **11**: 1808-1815
- 27 Allison SD, Treseder KK. Warming and drying suppress microbial activity and carbon cycling in boreal forest soils [J]. *Global Change Biol*, 2008, **14**: 2898-2909
- 28 Alef K, Kleiner D. Applicability of arginine ammonification as indicator of microbial activity in different soils [J]. *Biol Fertil Soils*, 1987, **5**: 148-151
- 29 Schmidt BHM, Kalbitz K, Braun S, Fuß R, McDowell WH, Matzner E. Microbial immobilization and mineralization of dissolved organic nitrogen from forest floors [J]. *Soil Biol Biochem*, 2011, **43** (8): 1742-1745
- 30 Geisseler D, Horwath WR. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon [J]. *Soil Biol Biochem*, 2008, **40**: 3040-3048
- 31 Kuzyakov Y, Friedel JK, Stahr K. Review of mechanisms and quantification of priming effects [J]. *Soil Biol Biochem*, 2000, **32**: 1485-1498
- 32 Burns RG, DeForest JL, Marxsen J, Sinsabaugh RL, Stromberger ME, Wallenstein MD, Weintraub MN, Zoppini A. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions [J]. *Soil Biol Biochem*, 2013, **58**: 216-234
- 33 Asmar F, Eiland F, Nielsen NE. Effect of extracellular-enzyme activities on solubilization rate of soil organic nitrogen [J]. *Biol Fertil Soils*, 1994, **17**: 32-38
- 34 Cusack DF. Soil nitrogen levels are linked to decomposition enzyme activities along an urban-remote tropical forest gradient [J]. *Soil Biol Biochem*, 2013, **57**: 192-203
- 35 Bach HJ, Munch JC. Identification of bacterial sources of soil peptidases [J]. *Biol Fertil Soils*, 2000, **31**: 219-224
- 36 Watanabe K, Hayano K. Source of soil protease based on the splitting sites of a polypeptide [J]. *Soil Sci Plant Nutr*, 1994, **40** (4): 697-701
- 37 Nygren CMR, Edqvist J, Elfstrand M, Heller G, Taylor FS. Detection of extracellular protease activity in different species and genera of ectomycorrhizal fungi [J]. *Mycorrhiza*, 2007, **17** (3): 241-248
- 38 周巧红, 吴振斌, 付贵萍, 成水平, 贺锋. 人工湿地基质中酶活性和细菌生理群的时空动态特征[J]. 环境科学, 2005, **26** (6): 108-112 [Zhou QH, Wu ZB, Fu GP, Cheng SP, He F. Temporal and spatial characteristics of substrate enzyme activities and bacteria physiological groups in constructed wetland [J]. *Environ Sci*, 2005, **26** (6): 108-112]
- 39 Sepers ABJ. Diversity of ammonifying bacteria [J]. *Hydrobiologia*, 1981, **83**: 343-350
- 40 赵满兴, Kalbitz K, 周建斌. 黄土区几种土壤培养过程中可溶性有机氮的变化及其与土壤矿化氮的关系[J]. 水土保持学报, 2008, **22** (4): 122-127 [Zhao MX, Kalbitz K, Zhou JB. Dynamics of soluble organic nitrogen and its relation to mineralization of soil organic nitrogen during incubation of several soils in Loess Region [J]. *J Soil Water Conserv*, 2008, **22** (4): 122-127]
- 41 Boyle SA, Yarwood RR, Bottomley PJ, Myrold DD. Bacterial and fungal contributions to soil nitrogen cycling under Douglas fir and red alder at two sites in Oregon [J]. *Soil Biol Biochem*, 2008, **40** (2): 443-451
- 42 王娟, 戴习林, 宋增福, 潘迎捷, 张庆华. 一株氨化细菌的分离、鉴定及氨氮降解能力的初步分析[J]. 水生生物学报, 2010, **34** (6): 1199-1201 [Wang J, Dai XL, Song ZF, Pan YJ, Zhang QH. Isolation and identification of ammonifying bacterium and characteristics of degrading NH₃-N [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2010, **34** (6): 1199-1201]
- 43 张文艺, 李秋艳, 赵婷婷, 李定龙, 姚立荣. BAF反应器中氨化细菌的筛选与氨化特性分析[J]. 环境工程学报, 2011, **5** (12): 2890-2894 [Zhang WY, Li QY, Zhao TT, Li DL, Yao LR. Isolation of ammonifying bacteria from BAF reactor and analysis on amination characterization [J]. *Tech Equip Environ Pollut Control*, 2011, **5** (12): 2890-2894]
- 44 马桂珍, 暴增海, 王淑芳, 吴少杰, 付泓润, 葛平华. 高产蛋白酶细菌的分离筛选及其种类鉴定[J]. 食品科学, 2011, **32** (21): 183-187 [Ma GZ, Bao ZH, Wang SF, Wu SJ, Fu HR, Ge PH. Screening and identification of high protease-producing bacteria [J]. *Food Sci*, 2011, **32** (21): 183-187]
- 45 Josephine FS, Ramya VS, Devi N, Ganapa SB, Siddalingeshwara KG, Venugopal N, Vishwanatha T. Isolation, production and characterization of protease from *Bacillus* sp. isolated from soil sample [J]. *J Microbiol*

- Biotechnol Res*, 2012, **2** (1): 163-168
- 46 Garnier P, Neel C, Aita C, Recous S, Lafolie F, Mary B. Modelling carbon and nitrogen dynamics in a bare soil with and without straw incorporation [J]. *Eur J Soil Sci*, 2003, **54**: 555-568
- 47 Smith JL, Norton JM, Paul EA. Decomposition of ¹⁴C- and ¹⁵N-labeled organisms in soil under anaerobic conditions [J]. *Plant Soil*, 1989, **116**: 115-118
- 48 Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G. Microbial diversity and soil functions [J]. *Eur J Soil Sci*, 2003, **54**: 655-670
- 49 Fuka MM, Engel M, Hagn A, Munch JC, Sommer M, Schlöter M. Changes of diversity pattern of proteolytic bacteria over time and space in an agricultural soil [J]. *Microb Ecol*, 2009, **57** (3): 391-401
- 50 Petersen DG, Blazewicz SJ, Firestone M, Herman DJ, Turetsky M, Waldrop M. Abundance of microbial genes associated with nitrogen cycling as indices of biogeochemical process rates across a vegetation gradient in Alaska [J]. *Environ Microbiol*, 2012, **14** (4): 993-1008
- 51 王兴春, 杨致荣, 王敏, 李玮, 李生才. 高通量测序技术及其应用[J]. 中国生物工程杂志, 2012, **32** (1): 109-114 [Wang XC, Yang ZR, Wang M, Li W, Li SC. High-throughput sequencing technology and its application [J]. *China Biotechnol*, 2012, **32** (1): 109-114]
- 52 Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, Daroub SH, Camargo FAO, Farmerie WG, Triplett EW. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity [J]. *ISME J*, 2007, **1** (4): 283-290
- 53 Chu HY, Fierer N, Lauber CL, Caporaso JG, Knight R, Grogan P. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes [J]. *Environ Microbiol*, 2010, **12** (11): 2998-3006
- 54 Bach HJ, Hartmann A, Schlöter M, Munch JC. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil [J]. *J Microbiol Methods*, 2000, **44**: 173-182
- 55 Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62** (3): 597-635
- 56 Sakurai M, Suzuki K, Onodera M, Shinano T, Osaki M. Analysis of bacterial communities in soil by PCR-DGGE targeting protease genes [J]. *Soil Biol Biochem*, 2007, **39** (11): 2777-2784
- 57 Yu K, Zhang T. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of microbial community structure and gene expression of activated sludge [J]. *PLoS ONE*, 2012, **7** (5): 1-13
- 58 Zakrzewski M, Goesmann A, Jaenicke S, Junemann S, Eikmeyer F, Szczepanowski R, Al-Soud WA, Sorensen S, Puhler A, Schlöter A. Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing [J]. *J Biotechnol*, 2012, **158** (4): 248-258
- 59 Wang XC, Niu QW, Teng C, Li C, Mu JY, Chua NH, Zuo JR. Overexpression of *PGA37/MYB118* and *MYB115* promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis* [J]. *Cell Res*, 2009, **19** (2): 224-235
- 60 吕昌勇, 陈朝银, 葛锋, 刘迪秋, 孔祥君. 微生物分子生态学研究方法的新进展[J]. 中国生物工程杂志, 2012, **32** (8): 111-118 [Lü CY, Chen CY, Ge F, Liu DQ, Kong XJ. The new development of the research method for molecular microbial ecology [J]. *China Biotechnol*, 2012, **32** (8): 111-118]
- 61 Zhou JZ, Xue K, Xie JP, Deng Y, Wu L, Cheng XL, Fei SF, Deng SP, He ZL, Van Nostrand JD. Microbial mediation of carbon-cycle feedbacks to climate warming [J]. *Nat Climate Change*, 2011, **2** (2): 106-110
- 62 He ZL, Xu MY, Deng Y, Kang S, Kellogg L, Wu LY, Nostrand JDV, Hobbie SE, Reich PB, Zhou JZ. Metagenomic analysis reveals a marked divergence in the structure of belowground microbial communities at elevated CO₂ [J]. *Ecol Lett*, 2010, **13** (5): 564-575
- 63 Nannipieri P, Giagnoni L, Renella G, Puglisi E, Ceccanti B, Masciandaro G, Fornasier F, Moscatelli MC, Marinari S. Soil enzymology classical and molecular approaches [J]. *Biol Fertil Soils*, 2012, **48**: 743-762