

百方知库
Eco-Environmental
Knowledge Web

环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV
HUANJING KEXUE

■ 主办 中国科学院生态环境研究中心
■ 出版 科学出版社



2019

Vol.40 No.6
第40卷 第6期

目次

北京城区大气金属元素干湿沉降特征 张国忠, 潘月鹏, 田世丽, 王永宏, 熊秋林, 李广, 顾梦娜, 吕雪梅, 倪雪, 何月欣, 黄威, 刘博文, 王跃思 (2493)

北京城郊 PM_{2.5} 中金属元素的污染特征及潜在生态风险评价 徐静, 李杏茹, 张兰, 陈曦, 杨阳, 刘水桥, 赵清 (2501)

上海城区二次气溶胶的形成: 光化学氧化与液相反应对二次气溶胶形成的影响 高杰, 乔利平, 楼晟荣, 严茹莎, 周敏, 刘瑜存, 冯加良, 黄丹丹 (2510)

天津市 2017 年重污染过程二次无机化学污染特征分析 徐虹, 肖致美, 陈魁, 李立伟, 杨宁, 高璟赞, 李源, 孔君, 毕温凯, 邓小文 (2519)

典型非金属矿物制造工艺过程源成分谱特征 赵雪艳, 于高峰, 王信梧, 张向炎, 殷宝辉, 刘盈盈, 王歆华, 杨文, 赵若杰 (2526)

垃圾焚烧厂排放颗粒物组分粒径分布特征 余卓君, 吴建会, 张裕芬, 张进生, 冯银厂, 李蒲 (2533)

天津市春季样方法道路扬尘碳组分特征及来源分析 马妍, 姬亚芹, 国纪良, 赵静琦, 李越洋, 王士宝, 张蕾 (2540)

霾天气下城市气溶胶吸湿性的观测 杨素英, 田芷洁, 张铁凝, 于兴娜, 李艳伟, 安俊琳, 赵秀勇, 李岩, 王梓航, 吴尚 (2546)

宁东能源化工基地大气 PM_{2.5} 中硝基多环芳烃污染特征及呼吸暴露风险 刘攀亮, 剧媛丽, 毛潇萱, 黄韬, 高宏, 马建民 (2556)

2014 ~ 2016 年间郑州市控制 PM₁₀ 和 PM_{2.5} 污染的健康效益评估 韩士杰, 王佳, 燕启社, 杨留明, 赵庆炎, 王申博, 李晨, 张轶舜, 张瑞芹 (2565)

1990 ~ 2017 年中国地区气溶胶光学厚度的时空分布及其主要影响类型 刘莹, 林爱文, 覃文敏, 何利杰, 李霄 (2572)

北京春季一次霾-沙天气污染特性与成因分析 王耀庭, 李青春, 郑祚芳, 窦有俊 (2582)

江苏省内河船舶大气污染物排放清单及特征 徐文文, 殷承启, 许雪记, 张玮 (2595)

亚热带稻区大气 NO₂、HNO₃ 及硝态氮污染特征及干湿沉降 欧阳秀琴, 王波, 沈健林, 朱潇, 王杰飞, 李勇, 吴金水 (2607)

长江源区降水氢氧稳定同位素特征及水汽来源 汪少勇, 王巧丽, 吴锦奎, 何晓波, 丁永建, 王利辉, 胡召富 (2615)

基于高山湖泊沉积记录的贵州北部大气重金属污染历史重建 梁梦瑶, 刘恩峰, 张恩楼, 纪明, 李小林 (2624)

青岛 4 个海水浴场微塑料的分布特征 罗雅丹, 林千惠, 贾芳丽, 徐功娣, 李锋民 (2631)

鄱阳湖湿地候鸟栖息地微塑料污染特征 刘淑丽, 简敏菲, 周隆胤, 李文华, 吴希恩, 饶丹 (2639)

三峡库区消落带土壤溶解性有机质溯源: 基于氮/碳比值的线性双端元源负荷分析 江韬, Joeri Kaal, 梁俭, 刘江, 张耀玲, 王定勇, 魏世强, 赵铮 (2647)

水生生物光合作用对雪玉洞岩溶水体中 CDOM 的影响 范佳鑫, 蒋勇军, 贺秋芳, 王家楠, 何瑞亮, 张彩云, 马丽娜, 汪啟容 (2657)

水化学和环境同位素对济南东源饮用水源地地下水演化过程的指示 张雅, 苏春利, 马燕华, 刘伟江 (2667)

崇左响水地区地下水水质分析及健康风险评价 周巾枚, 蒋忠诚, 徐光黎, 覃小群, 黄奇波, 张连凯 (2675)

云南荞麦地流域地下水水化学特征及物质来源分析 张勇, 郭纯青, 朱彦光, 于爽 (2686)

鄱阳湖流域多尺度 C、N 输送通量及其水质参数变化特征 陆瑶, 高扬, 贾珺杰, 宋贤威, 陈世博, 马明真, 郝卓 (2696)

合流制面源污染传输过程与污染源解析 房金秀, 谢文霞, 朱玉玺, 沈雷, 马玉坤, 李佳, 姜智绘, 李叙勇, 赵洪涛 (2705)

强化浅基质层干植草沟对道路径流的脱氮效果 段进凯, 李田, 张佳炜 (2715)

水源水库暴雨径流过程水体锰的迁移及其影响 邓立凡, 黄廷林, 李楠, 李凯, 吕晓龙, 毛雪静 (2722)

巢湖十五里河沉积物磷吸附潜力及对外源碳的响应 李如忠, 鲍琴, 张瑞钢, 陈志 (2730)

金盆水库沉积物磷的来源及分布特征 毛雪静, 黄廷林, 李楠, 徐金兰, 苏露, 吕晓龙, 邓立凡 (2738)

水库水体热分层的水质及细菌群落分布特征 王禹冰, 王晓燕, 庞树江, 杨晓明, 刘洋 (2745)

不同水温分层水库沉积物间隙水营养盐垂向分布与细菌群落结构的关系 王慎, 张思思, 许允, 官卓宇, 杨正健, 刘德富, 马骏 (2753)

表面流人工湿地长期运行后的底泥营养盐累积特征与释放规律 朱伊梦, 姜翠玲, 朱立琴, 杜观超, 高旭, 陈红卫, 李峰东, 张海阔, 张雪, 秦文凯, 李一平 (2764)

针铁矿改性生物炭对砷吸附性能 朱司航, 赵晶晶, 尹英杰, 商建英, 陈冲, 瞿婷 (2773)

改性稻壳生物炭对水溶液中甲基橙的吸附效果与机制 史月月, 单锐, 袁浩然 (2783)

厌氧膜生物反应器处理含盐废水运行效能及膜污染特性 闫欢沙, 许振钰, 金春姬, 邵梦雨, 郭亮, 赵阳国 (2793)

污水处理厂出水有机磷污染特征及强化去除 王小东, 王子文, 陈明飞, 王燕, 王硕, 李激 (2800)

碱度对沸石序批式反应器亚硝化的影响 王瑞鑫, 陈婧, 汪晓军, 胡浩林, Karasuta Chayangkun (2807)

活性污泥物理结构对呼吸过程的影响 郭耀, 李志华, 杨成建, 王慧娟, 李亚明, 姜阳 (2813)

好氧颗粒污泥处理畜禽养殖沼液污染物的特性 廖杰, 叶嘉琦, 曾志超, 刘琳, 徐开钦, 刘超翔 (2821)

快速城市化区河流温室气体排放的时空特征及驱动因素 刘婷婷, 王晓锋, 袁兴中, 龚小杰, 侯春丽 (2827)

生物炭对潜流人工湿地污染物去除及NO_x排放影响 邓朝仁, 梁银坤, 黄磊, 方丹丹, 陈玉成, 杜刚 (2840)

曾用抗生素磺胺二甲嘧啶对稻田N₂O排放的影响及其微生物机制 吴杰, 李志琳, 徐佳迎, 王珏, 蒋静艳 (2847)

不同施氮水平对紫花苜蓿草地土壤呼吸和土壤生化性质的影响 胡伟, 张亚红, 李鹏, 张鹏, 李满友, 尤璟涛, 田水泉 (2858)

典型城市化区域土壤重金属污染的空间特征与风险评价 何博, 赵慧, 王铁宇, 孟晶, 肖荣波, 刘胜然, 周云桥, 史斌 (2869)

西南高镉地质背景区农田土壤与农作物的重金属富集特征 刘意章, 肖唐付, 熊燕, 宁增平, 双燕, 李航, 马良, 陈海燕 (2877)

基于 GIS 和受体模型的枸杞地土壤重金属空间分布特征及来源解析 白一茹, 张兴, 赵云鹏, 王幼奇, 钟艳霞 (2885)

喀斯特地区小尺度农业土壤砷的空间分布及污染评价 汪花, 刘秀明, 刘方, 唐启琳, 王世杰 (2895)

黄土高原不同植被带人工刺槐林土壤团聚体稳定性及其化学计量特征 瞿晴, 徐红伟, 吴旋, 孟敏, 王国梁, 薛蓁 (2904)

秸秆还田配施氮肥对喀斯特农田微生物群落及有机碳矿化的影响 徐学池, 苏以荣, 王桂红, 刘坤平, 胡亚军, 陈香碧, 郑小东, 何寻阳 (2912)

生物炭施用及老化对紫色土中抗生素吸附特征的影响 阴文敏, 关卓, 刘琛, 何杨, 杨飞, 唐翔宇 (2920)

稳定性同位素 DNA-SIP 示踪中性紫色土的氮氧化过程 刘天琳, 王智慧, 闫小娟, 赵永鹏, 贾仲君, 蒋先军 (2930)

纳米银和银离子对土壤中硝化微生物及其氮氧化速率的影响 伍玲丽, 张旭, 舒昆慧, 张丽, 司友斌 (2939)

农田沟道土壤中锰氨氧化(Mn-ANAMMOX)过程的探究 陈湜, 李正魁, 覃云斌, 丁帮琛, 陈志浩 (2948)

污泥四环素含量对蚯蚓堆肥中氨氧化菌群的影响 吴颖, 黄魁, 夏慧, 陈景阳 (2954)

《环境科学》征订启事(2929) 《环境科学》征稿简则(2947) 信息(2646, 2656, 2857)

稳定性同位素 DNA-SIP 示踪中性紫色土的氨氧化过程

刘天琳¹, 王智慧¹, 闫小娟¹, 赵永鹏¹, 贾仲君², 蒋先军^{1*}

(1. 西南大学资源环境学院, 重庆 400715; 2. 中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008)

摘要: 研究表明酸性土壤中氨氧化作用主要是由氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)催化进行;而在中性和碱性土壤中则主要是由氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)主导. 虽然 AOA 在中性土壤中具有很高的丰度,但其对硝化过程的贡献仍不清楚. 因此本文选取 pH 为 7.2 的中性紫色土为研究对象,通过稳定性同位素核酸探针技术结合克隆测序探究中性紫色土中活性氨氧化微生物群落组成. 结果表明中性紫色土的净硝化速率为 $9.68 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$, AOA 和 AOB 在中性紫色土中均有较高的丰度且共同推动硝化作用的进行. 系统发育分析结果表明培养初期(0d)在数量上占优势的 AOB 为 *Nitrosospira* Cluster 3a. 1, 而 *Nitrosospira* Cluster 3a. 2 只占较小的一部分, 经过 56d 的培养后 *Nitrosospira* Cluster 3a. 2 替代了 *Nitrosospira* Cluster 3a. 1 成为主导氨氧化的活性 AOB. 培养初期(0d)在数量上占优势的 AOA 是 *Nitrososphaera* Subcluster 9, 但经过培养后变为 *Nitrososphaera* Subcluster 3. 2/3. 3. 在培养期间 AOA 和 AOB 的群落结构均发生了改变. 对¹³C标记 DNA 的测序分析证明 AOA 和 AOB 在硝化过程中都起着重要作用, 主导氨氧化的活性 AOA 和 AOB 主要分别隶属于 *Nitrososphaera* Subcluster 3. 2/3. 3 和 *Nitrosospira* Cluster 3a. 2. 本研究明确了 AOA 及 AOB 对中性紫色土氨氧化过程的推动作用并从微生物层面探究硝化作用的发生机制, 为进一步研究紫色土中硝化作用提供理论基础.

关键词: 硝化作用; 氨氧化微生物; 多样性; 休眠; 群落结构

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2019)06-2930-09 DOI: 10.13227/j.hjkk.201811229

Ammonia Oxidation in a Neutral Purple Soil Measured by the ¹³C-DNA-SIP Method

LIU Tian-lin¹, WANG Zhi-hui¹, YAN Xiao-juan¹, ZHAO Yong-peng¹, JIA Zhong-jun², JIANG Xian-jun^{1*}

(1. College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: Increasing evidence suggests that ammonia oxidation in acidic soils is primarily catalyzed by ammonia-oxidizing archaea (AOA), while ammonia-oxidizing bacteria (AOB) drive ammonia oxidation in neutral and alkaline soils in which AOA overwhelmingly outnumber AOB. Therefore, neutral purple soil with a pH of 7.2 was selected to study the composition of the active ammonification microbial community with a stable isotope nucleic acid probe technique combined with cloning sequencing. Results showed that the nitrification rate was $9.68 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$, and AOA and AOB were abundant in neutral purple soils. By using DNA-based stable isotope probing (SIP), we gathered strong evidence of archaeal ammonia oxidation by AOA and AOB. Phylogenetic analysis indicated that the *Nitrosospira* Cluster 3a. 1 AOB was dominant in terms of quantity at 0 days, and the *Nitrosospira* Cluster 3a. 2 only accounted for a small part. After 56 days of cultivation, the *Nitrosospira* Cluster 3a. 2 replaced the *Nitrosospira* Cluster 3a. 1 as the active AOB that dominated ammonia oxidation. The AOA that predominated quantitatively at day 0 was *Nitrososphaera* Subcluster 9, but after cultivation this became *Nitrososphaera* Subcluster 3. 2/3. 3. Thus, the community structure of AOA and AOB changed. Active autotrophic nitrification was found in this neutral purple soil. Sequencing analysis of the ¹³C-labeled DNA provided robust evidence that both archaea and bacteria played important roles in the nitrification and not all ammonia oxidizers in native soil were active in the nitrification. Phylogenetic analysis clearly showed that the dominant active archaea and bacteria during the incubation were affiliated with *Nitrososphaera* Subcluster 3. 2/3. 3 within the soil group 1. 1b lineage and *Nitrosospira* Cluster 3a. 2, respectively, which were different from the dominant ammonia oxidizers at the beginning of the incubation. These results suggest that the community structure of ammonia oxidizers can shift quickly upon changes in the substrate availability in soils.

Key words: nitrification; ammonia-oxidizing microorganisms; diversity; dormancy; community structure

农田生态系统中氮肥的大量施加在提高农作物产量的同时也带来了一系列的环境问题:施入土壤中的铵态氮肥通过硝化作用被氧化为硝酸盐,易于从土壤中淋失;硝化作用为反硝化作用提供底物,也增加了温室气体排放的风险^[1, 2]. 因此氨氧化作用作为硝化作用的限速步骤,其推动者——氨氧化微生物被认为在维持农田生态系统平衡以及环境管

理中扮演十分重要的角色.

氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)和氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)是

收稿日期: 2018-11-27; 修订日期: 2018-12-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(41671232); 西南大学资源环境学院光炯创新项目

作者简介: 刘天琳(1995~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤肥力, E-mail: 15802354130@163.com

* 通信作者, E-mail: jiangxj@swu.edu.cn

典型的氨氧化微生物, 具有编码催化氨氧化作用的氨单加氧酶(AMO)基因^[3, 4]. 氨单加氧酶亚基 A (*amoA*) 在氨氧化微生物中广泛存在并可以作为氨氧化微生物的特异性标记. 前人利用 *amoA* 可以特异性标记的特性进行研究, 表明 AOA 可能主导了土壤中的硝化作用^[5]. Jia 等^[6] 曾用 DNA 稳定性同位素核酸探针技术(DNA/RNA-based stable isotope probing, DNA/RNA-SIP) 证明在中性土壤中 AOB 主导了土壤中的硝化作用. 大量研究表明硝化作用对 pH 高度敏感^[7, 8], 在 pH 为 4.8 ~ 8.5 的土壤中进行实验, 结果表明较高的 pH 可以刺激硝化作用^[9], 对微生物的培养实验也得到了同样的结果^[10]. pH 可以影响硝化作用的底物从而影响土壤硝化速率^[11]. 当 pH 较低时氨分子趋向转变为铵离子, 氨氧化作用的底物含量降低, 从而使硝化速率减慢. pH 对土壤中氨氧化微生物的丰度和群落结构有显著的影响^[12, 13]. 相比于 AOB, AOA 对 pH 有更强的适应力^[14], 有研究表明, 酸性土壤中 AOA 主导土壤中自养氨氧化过程^[15~18]; 在中性或碱性土壤中, 则是由 AOB 主导^[6, 19, 20].

虽然通常认为在中性及碱性的土壤环境中硝化作用是由 AOB 主导, 但是在中酸性($5 \leq \text{pH} < 7$) 和碱性($\text{pH} > 7$) 土壤中 AOA 都有特别高的丰度, 并且随着 pH 的增加 AOA 的丰度及多样性也有所增加和变化^[12]. 宏基因组分析表明在酸性土壤中的硝化作用由 *Nitrosotalea* AOA^[21] 或 *Nitrososphaera* AOA 主导^[22], 且中性及碱性土壤中 *Nitrososphaera* AOA 在数量上占优势. 目前大部分硝化微生物的活性都是通过测定 AOA 和 AOB 丰度推测得到, 但是存在部分氨氧化微生物基因有可能没有表达或者酶失活的情况, 所以丰度并不能表明 AOA 和 AOB 对硝化作用的相对贡献. 在原位条件下诠释 AOA 和 AOB 对硝化作用的相对贡献是一个难题.

DNA-SIP 是通过利用稳定性同位素在分子水平对由微生物驱动的过程进行研究, DNA-SIP 是将功能与复杂环境中活性微生物的分类联系起来的有力手段^[23]. DNA-SIP 的成功完全依赖于基因组复制和需要在标记的底物上生长的目标微生物的主动繁殖, 微生物可利用稳定性同位素生长繁殖从而利用同位素来示踪活性微生物. DNA-SIP 为验证活性微生物的存在提供了确凿的证据. DNA-SIP 实验已经证明了在 $\text{pH} > 6.5$ 的土壤中 AOB 在硝化作用中发挥作用, 但目前仍不清楚丰度很高的 *Nitrososphaera* AOA 在中性紫色土壤中是否发挥着重要作用^[24, 25]. 有研究表明在西南地区中性紫色土中 AOA 和 AOB 共存且可能共同推动硝化作用的进

行^[26, 27], 但没有确凿的证据. 因此, 在本实验中采用 DNA-SIP 技术结合克隆文库分析方法, 对中国西南农业地区中性紫色土的活性硝化微生物群落进行了研究, 探究 AOA 及 AOB 对中性紫色土硝化作用的贡献.

1 材料与方法

1.1 样地描述及样品采集

供试土壤采自重庆市永川区(N29° 23', E105° 59'), 该地区属于亚热带季风气候, 全年平均气温 18.7°C, 平均降水量为 1380 mm. 取土前首先去除土壤表层的植被及腐殖质层, 按 5 点取样法钻取 0 ~ 20 cm 耕层土样, 去除枯枝落叶及根系等杂物后自然风干. 一部分土壤过 2 mm 筛后储存于 4°C 冰箱用于培养实验; 另一部分过 1 mm 筛用于土壤理化性质的测定^[28]. 土壤的基本理化性质: pH 为 7.2, 有机质为 12.90 g·kg⁻¹, 全氮为 0.97 g·kg⁻¹, 全磷为 8.91 g·kg⁻¹, 铵态氮为 1.08 mg·kg⁻¹, 硝态氮为 16.50 mg·kg⁻¹.

1.2 土壤样品培养与测定

本实验利用稳定性同位素核酸探针技术(DNA/RNA-based stable isotope probing, DNA/RNA-SIP)^[28], 在 120 mL 的培养瓶中加入 8 g 干重的风干土壤样品并调节土壤含水量至土壤田间最大持水量的 60%, 并设置 ¹²C₂O₂、¹³C₂O₂ 和 ¹³C₂O₂ + C₂H₂ (100 Pa) (对照) 这 3 种处理, 调节 CO₂ 体积分数为 5%. 所有处理每周均加入 100 μg·g⁻¹ 铵态氮(尿素)并在 28°C 的避光培养箱中培养 8 周(56 d). 每个瓶子每周打开一次, 以便添加 N 源和进行空气交换以保持有氧条件. 通过添加灭菌水补偿水分损失, 在瓶中重新密封后, 更换 ¹³C₂O₂、¹²C₂O₂ 和 C₂H₂ 气体.

在第 0 d 和第 56 d 破坏性采样, 每个处理 3 个重复, 每个重复约 2 g 土壤. 将一部分土样立即储存在 -80°C 冰箱中用于提取土壤 DNA. DNA 提取采用 Fast DNA spin kit for soil (MP Biomedicals, Cleveland, OH, USA) 试剂盒, 称取 0.5 g 土样并按照试剂盒操作步骤进行提取的 DNA 被用于后续的分层离心和 *amoA* 基因的定量. 其余土壤采用紫外分光光度计方法测定铵态氮及硝态氮含量.

1.3 超高速离心分层以及分层 DNA 的回收纯化

约 3.0 μg 的总 DNA 与 CsCl 溶液彻底混匀, 以达到 1.725 g·mL⁻¹ 的初始 CsCl 浮力密度, 并放置于 5.1 mL 的超高速离心管中. 上机进行超高速离心(Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA), 超高速离心结束后, 用取代法去离子水以注入离心试管

内,依次获得不同浮力密度 DNA,离心液共分为 15 层,测定每一层溶液的折光率并计算浮力密度^[29]. DNA 回收纯化按照 Jia 等^[6]的方法溶解在 30 μL 的离心管中.

1.4 定量 PCR 分析

按照说明书使用 SYBR Premix Ex Taq TM 试剂盒并在 CFX96 Optical Real-Time PCR System 扩增仪上进行分析,PCR 反应总体积为 20 μL ,包含模板 DNA、上下游引物^[30,31]和 Taq DNA 聚合酶^[29]. 反应条件参考文献^[28].

1.5 AOB 和 AOA *amoA* 基因克隆测序

对中性紫色土培养 0 d ^{12}C 标记的轻浮力密度梯度带和培养 56 d ^{13}C 标记的重浮力密度梯度带进行构建氨氧化古菌及氨氧化细菌的克隆文库. 以 0 d ^{12}C 标记的轻层 DNA 和 56 d ^{13}C 标记的重层 DNA 为模板并分别采用相应的引物 Arch-*amoA*-F/R 和 *amoA*-1F/2R 扩增. 再将其 PCR 产物按照说明书使用 pEASY-T3 Cloning Kit (Trans Gen Biotech) 进行克隆测序:①配置好培养基离心管及 PCR 管的灭菌;②PCR 扩增及产物的纯化;③链接和转化;④阳性重组子的鉴定和测序,获得目标基因序列^[27].

在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 的数据库中搜索并进行 Blast 比对,获得高度相近的同源基因序列;采用 MEGA 软件进行分析,将序列进行分类并建立系统发育树,根据序列在系统进化树中的位置和遗传距离判定测序克隆的系统发育地位^[29].

序列遗传信息已上传 NCBI 数据库, AOA 和 AOB 的序列查询号分别为 KY950303-KY950330 和 KY950331-KY950348.

1.6 数据分析

本研究中采用 SPSS 18.0 进行统计分析,分析方法为 one-way ANOVA;硝态氮、铵态氮的含量, AOA 及 AOB *amoA* 功能基因拷贝数, AOA、AOB 在每个 Subcluster/Cluster 上的相对丰度等在 Excel 中处理;采用 Origin 8.6 作铵态氮及硝态氮的含量及 AOA 和 AOB 的丰度图;克隆测序序列通过 NCBI-Blast 进行比对,系统发育树作图采用 Mega 4.0.

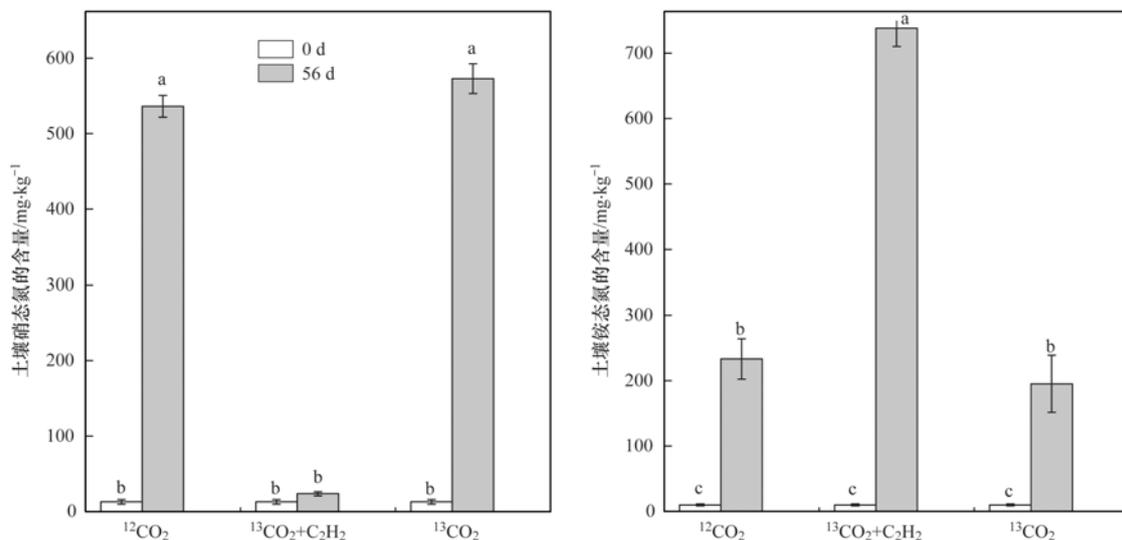
2 结果与分析

2.1 硝化活性

0 d 时 NO_3^- -N 含量为 12.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 56 d 时 $^{12}\text{CO}_2$ 和 $^{13}\text{CO}_2$ 处理的 NO_3^- -N 含量分别增加到 536 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 572 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (图 1). 经过计算中性紫色土的净硝化速率为 9.68 $\text{mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$, 而加入 C_2H_2 处理硝化作用明显被抑制. 在 3 种处理中明显观察到 NH_4^+ -N 的积累, 但是 $^{12}\text{CO}_2$ 和 $^{13}\text{CO}_2$ 处理中 NH_4^+ -N 的含量没有显著差异, 在 $^{13}\text{CO}_2 + \text{C}_2\text{H}_2$ 处理中 NH_4^+ -N 含量达到了 738 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

2.2 氨氧化古菌 (AOA) 和氨氧化细菌 (AOB) 丰度

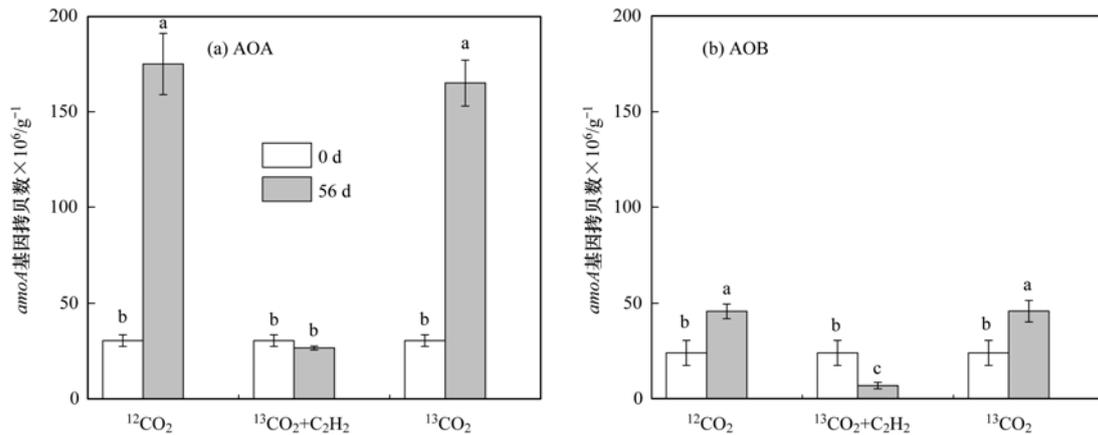
培养初期 (0 d) 和培养 56 d 土壤样品的 AOA 和 AOB 功能基因 (*amoA*) 拷贝数变化如图 2 所示. 培养初期 AOA *amoA* 基因拷贝数 (以干土计, 下同) 为 $3.05 \times 10^7 \text{g}^{-1}$, 经过 56 d 的培养 $^{12}\text{CO}_2$ 和 $^{13}\text{CO}_2$ 标记处理的 AOA *amoA* 基因拷贝数分别增加到 $1.75 \times 10^8 \text{g}^{-1}$ 和 $1.65 \times 10^8 \text{g}^{-1}$. 56 d $^{13}\text{CO}_2 + \text{C}_2\text{H}_2$ 处理的 AOA *amoA* 基因拷贝数与 0 d 相比没有显著差异. 对于 AOB *amoA* 基因拷贝数来说, 培养初期 AOB *amoA* 基因拷贝数为 $2.40 \times 10^7 \text{g}^{-1}$, 经过 56 d



误差线表示标准差, 字母表示不同培养时间和处理之间的显著性差异 ($P < 0.05$)

图 1 中性紫色土中土壤铵态氮和硝态氮含量的变化

Fig. 1 Changes in concentrations of soil ammonium and nitrate in neutral purple soil



误差线表示标准差, 字母表示不同培养时间和处理之间的显著性差异 ($P < 0.05$)

图2 中性紫色土氨氧化古菌 (AOA) 及氨氧化细菌 (AOB) *amoA* 基因拷贝数

Fig. 2 Copy number of archaeal and bacterial *amoA* genes in neutral purple soil

的培养, $^{12}\text{CO}_2$ 和 $^{13}\text{CO}_2$ 标记处理的 AOB *amoA* 基因拷贝数分别增加到 $4.60 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$ 和 $4.87 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$, $^{13}\text{CO}_2 + \text{C}_2\text{H}_2$ 减小到 $6.99 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ ($P < 0.05$).

2.3 $^{13}\text{CO}_2$ -活性氨氧化微生物 DNA 标记

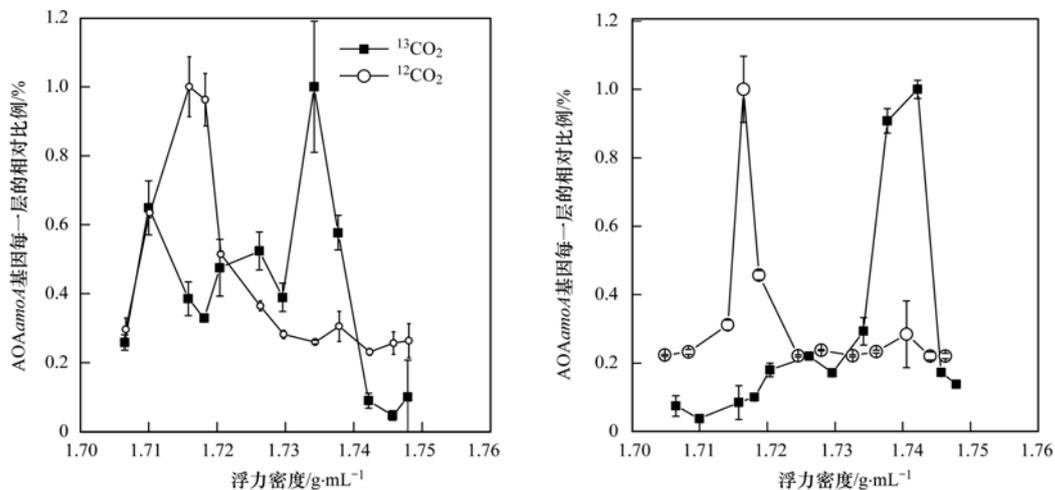
根据 DNA 的不同浮力密度把 ^{13}C -DNA 和 ^{12}C -DNA 分开, 利用荧光定量 PCR 对 AOA 及 AOB 的 *amoA* 基因进行定量 (图 3). 被 ^{13}C 标记上的 AOA 或 AOB 被认为是活性氨氧化微生物^[6]. 图 3 中 $^{12}\text{CO}_2$ 处理均为单峰, 都处于轻层. $^{13}\text{CO}_2$ 处理中 AOA 及 AOB 在重层均有一峰, 说明在培养过程中 AOA 及 AOB *amoA* 功能基因被成功标记. 以上结果表明在中性紫色土中 AOA 和 AOB 都参与氨氧化过程.

2.4 氨氧化微生物群落结构分析

从 AOA 和 AOB 克隆文库中均随机挑选了 40 个单菌送去测序, 对测得的基因序列进行相似性分析. 0 d 和 56 d 中性紫色土 AOA 克隆测序分析分别

得到 34 个和 28 个可用序列, 按照 $> 97\%$ 相似性进行 OUT 分类分别得到 17 个和 11 个 OUT (图 4); 0 d 和 56 d 中性紫色土 AOB 克隆测序分析分别得到 40 个和 23 个可用序列, 按照 $> 97\%$ 相似性进行 OUT 分类分别得到 8 个和 10 个 OUT (图 5). 从系统发育树上可以看出, 发挥活性的 AOA 均属于 group I. 1b-*Nitrososphaera*, 而发挥活性的 AOB 均属于 *Nitrospira*.

从 0 d 和 56 d AOA *amoA* 功能基因系统发育来看 (图 4), 有 5 个 *Nitrososphaera* Subclusters. 如图 6 所示, *Nitrososphaera* Subcluster 3. 2/3. 3 的相对丰度由 0 d 时的 9% 增长到 56 d 的 40%, 成为了 SIP 培养后的主导 Subcluster, 且在 *Nitrososphaera* Subcluster 3. 2/3. 3 中增长最多的序列 (18%) 与从水稻根际中获得的 paddy soil DGGE band (HQ012652) 有密切的亲缘关系. 在第 0 d



误差线表示标准差

图3 中性紫色土各处理分层后氨氧化古菌 (AOA) *amoA* 和氨氧化细菌 (AOB) *amoA* 功能基因拷贝数比例分布

Fig. 3 Quantitative distribution of the archaeal and bacterial *amoA* genes across the entire buoyant density gradient of the DNA fractions in the neutral purple soil

Nitrososphaera Subcluster 9 (38%) 和 *Nitrososphaera* Subcluster 8.1/8.2 (32%) 的相对丰度占比较高, 起到主导作用. 但是经过 8 周的培养 *Nitrososphaera* Subcluster 9 和 *Nitrososphaera* Subcluster 8.1/8.2 的相对丰度分别下降了 1.4 倍和 3.2 倍, 分别下降为 23% 和 10%. 下降程度最大的 *Nitrososphaera* Subcluster 8.1/8.2 与在土壤中发现的 uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone (KM402412) 有密切的亲缘关系. *Nitrososphaera* Subcluster 2.1 在 0 d

(18%) 和 56 d (17%) 的相对丰度没有显著的变化. 与河岸土壤中发现的 environmental clone (GQ906648) 有密切亲缘关系的 *Nitrososphaera* Subcluster 4.1, 在 0 d AOA *amoA* 功能基因的相对丰度为 3%, 而在 56 d 并没有发现该序列. 与之相反的是与 *N. viennensis* EN76 (FR773159) 有密切亲缘关系的 *Nitrososphaera* Subcluster 1.1 在 0 d 并没有检测到, 而在 56 d 的标记培养后, 其相对丰度达到了 10%.

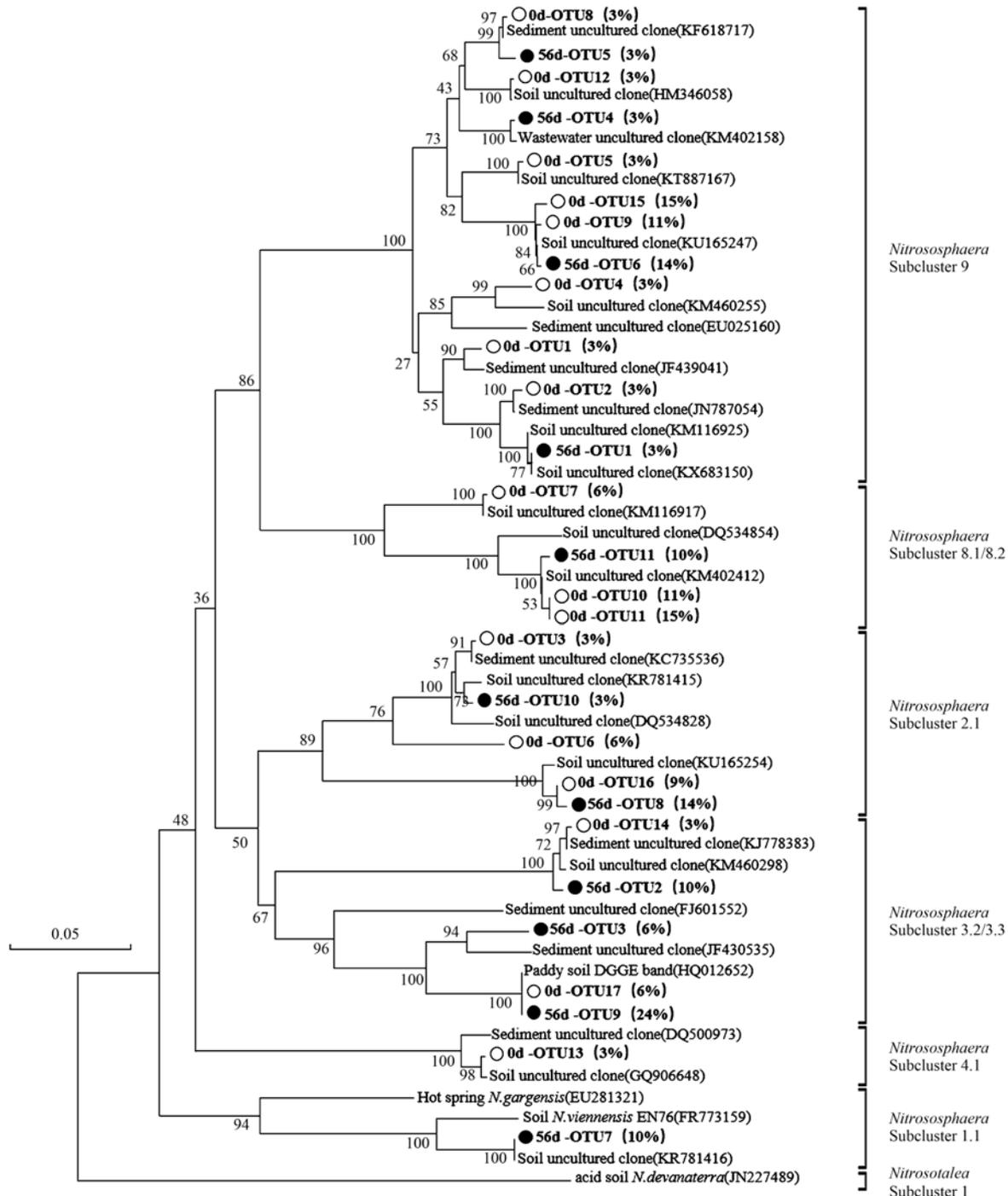


图 4 中性紫色土 0 d ^{12}C 标记处理及 56 d ^{13}C 标记处理氨氧化古菌 (AOA) *amoA* 功能基因系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic analysis of the archaeal *amoA* genes from the ^{12}C -labeled microcosms at 0 d and the ^{13}C -labeled microcosms at 56 d of incubation in the neutral purple soil

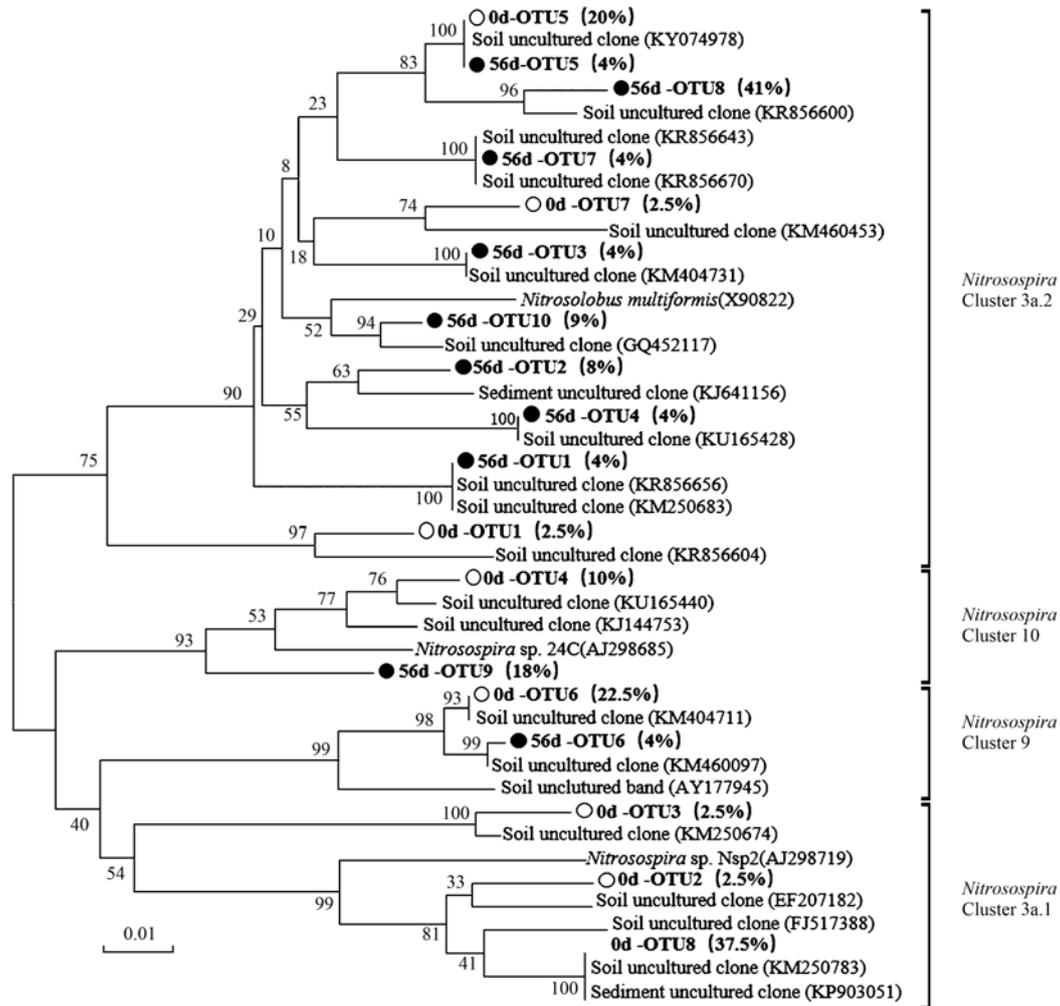


图5 中性紫色土 0 d ^{12}C 标记处理及 56 d ^{13}C 标记处理氨氧化细菌 (AOB) *amoA* 功能基因系统

Fig. 5 Phylogenetic analysis of the bacterial *amoA* genes from the $^{12}\text{CO}_2$ -labeled microcosms at 0 d and the $^{13}\text{CO}_2$ -labeled microcosms at 56 d of incubation in the neutral purple soil

经过 56 d 的标记培养后, AOB 的群落结构也发生了一系列的变化(图 5 和图 6). 0 d 与 *Nitrosospira multiformis* (X0822) 有密切亲缘关系的 *Nitrosospira* Cluster 3a.2 的相对丰度为 25%, 在经过 56 d 的 ^{13}C 标记培养实验后显著增加到了 78%. 与 *Nitrosospira* sp. 24C (AJ298685) 有密切亲缘关系的 *Nitrosospira* Cluster 10 的相对丰度由 0 d 的 10% 增加到了 56 d 的 18%. *Nitrosospira* Cluster 3a.1 与 *Nitrosospira* sp. Nsp2 (AJ298719) 有密切的亲缘关系, 在 0 d 时占主导地位, 但 56 d 培养后, 该 Cluster 3a.1 AOB 消失了. *Nitrosospira* Cluster 9 在培养初期占 AOB 相对丰度的 22.5%, 而在培养结束后降低到了 4%.

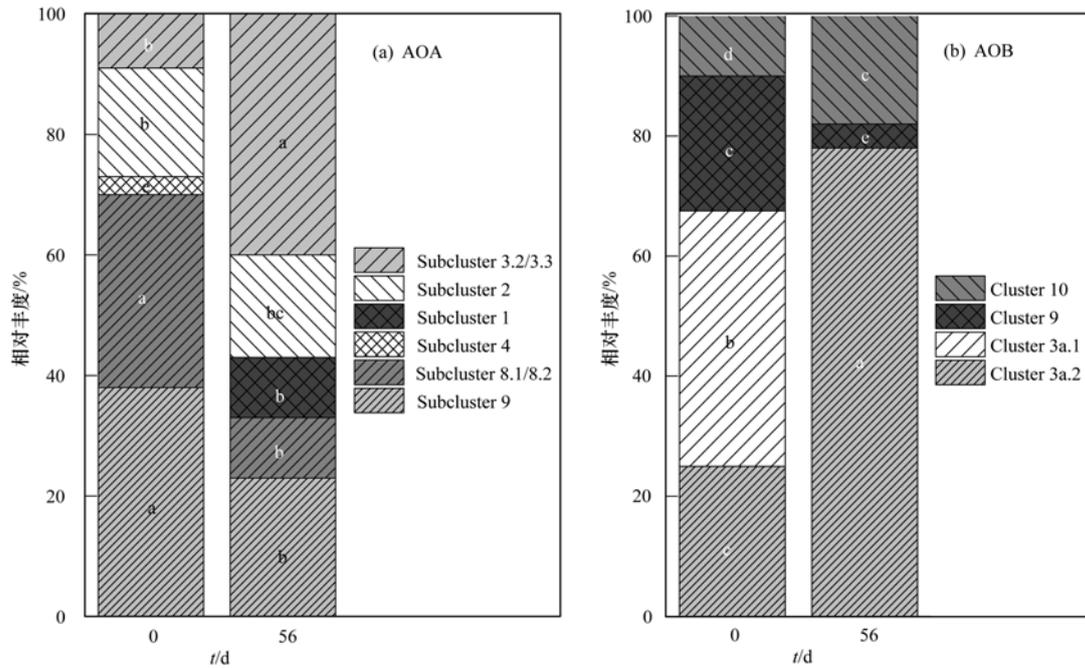
总之 AOA 和 AOB 在 56 d 的 SIP 培养后群落结构均发生了变化. 对 AOA 来说, 在第 0 d 占主导的为 *Nitrososphaera* Subcluster 8.1/8.2 和 *Nitrososphaera* Subcluster 9, 但是经过 56 d 的培养后, 占主导的 AOA 为 *Nitrososphaera* Subcluster 3.2/

3.3; 对 AOB 而言, 在 0 d 占主导的为与 *Nitrosospira* sp. Nsp2 有密切亲缘关系的 Cluster 3a.1, 培养后占主导的 AOB 为与 *Nitrosospira multiformis* 有密切亲缘关系的 Cluster 3a.2.

3 讨论

本研究结果为 AOA 和 AOB 在中性紫色土中共同催化自养硝化作用提供了充足的证据. 就目前所了解到的, 这是第一次报道 ^{13}C 标记的 *Nitrososphaera*-like AOA 在好氧中性紫色土的硝化作用中发挥活性.

中性紫色土 (pH = 7.2) 的平均净硝化速率为 $9.68 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$, 且在培养期间 AOA 及 AOB 的丰度也增加. $^{13}\text{CO}_2$ 标记实验表明在培养期间 AOA 及 AOB 被同时标记(图 3)表明中性紫色土中, AOA 及 AOB 共同参与了硝化作用. AOA 和 AOB 在不同的生境中的氨氧化过程中发挥着不同的作用, 例如 pH^[18]、温度^[32]、含水量^[33]及溶解氧浓度^[34]. 有研



字母表示不同 Cluster/Subcluster 的相对丰度的显著性差异 ($P < 0.05$)

图6 中性紫色土中氨氧化古菌(AOA)及氨氧化细菌(AOB)的 *amoA* 基因在 0 d 及 56 d 每个 Cluster/Subcluster 的相对丰度

Fig. 6 Distribution of archaeal and bacterial *amoA* Subclusters/Clusters retrieved at 0 d and 56 d in the neutral purple soil

究表明,在酸性土壤环境中 AOA 主导氨氧化作用,并且在 pH 低于 5.5 的情况下 AOA 有可能是氨氧化作用的唯一驱动者^[16, 28]. 虽然 AOA 和 AOB 对 pH 有选择适应性,但它并不能使 AOA 和 AOB 产生分离^[12, 16]. 有研究表明 AOA 的丰度和群落多样性随着 pH 的升高而增加^[12],这也暗示了部分 AOA 可能在中性或者碱性土壤中也可能有活性. 在本研究中 AOA/AOB 在未培养中性土中的比例为 1.27,表明 AOA 与 AOB 在中性环境中共存. 随着硝化作用的进行,在 56 d 的¹³CO₂标记培养后 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因同时被标记,这有力地证明了 AOA 和 AOB 都在这种中性紫色土硝化作用中具有活性.

培养初期(0 d) *Nitrosospira* Cluster 3a.1 的相对丰度最高,而 *Nitrosospira* Cluster 3a.2 的相对丰度只占 AOB *amoA* 基因丰度的 1/4. 经过 56 d 的培养后 *Nitrosospira* Cluster 3a.2 取代了 *Nitrosospira* Cluster 3a.1,成为主导的 AOB Cluster. 在培养初期(0d) AOA 在数量上占优势的是 *Nitrososphaera* Subcluster 9,但经过培养后,占优势的变为 *Nitrososphaera* Subcluster 3.2/3.3. AOA 和 AOB 的群落结构在培养过程中发生了变化. 这表明 *Nitrososphaera* Subcluster 9 和 *Nitrososphaera* Subcluster 8.1/8.2 在中性紫色土氨氧化作用中起到的作用不大. 因此氨氧化微生物 *amoA* 基因丰度并不等同于活性,这也进一步证实了并不是所有含有 *amoA* 基因的氨氧化微生物都具有活性从而参与氨氧化过程. AOA 或 AOB 谱系的多样性可能是基

于对土壤 pH 值或其他环境因素的特定适应性而演变的结果,从而显示出生态位的特异性分化. 例如,在酸性高山土壤中^[25]和强酸性土壤中^[35]发现了活性 AOA Group I.1a-associated (*Nitrosotalea* Cluster)的存在. 而在 pH 较高的环境中则是 *Nitrososphaera* 有更高的丰度^[36-39]. 在酸性土壤中,隶属于 *Nitrosospira* Cluster 10、11 及 12 的 AOB 占主导地位,而在 pH 较高的环境中则是 *Nitrosomonas* cluster 6、7 及 *Nitrosospira* Cluster 3a.1、3a.2 的 AOB 类群^[35]. 其他的影响因素例如氮肥的增施^[40]、含水量^[33]及土地利用方式^[41]也会对 AOA 及 AOB 的群落结构组成产生一定的影响. AOA 或 AOB 只能根据长期的进化变化来发展它们的“多样性”,以适应不同的环境,并且它们也可能在短期环境压力下变成“休眠”状态^[42]. 休眠微生物能够解释和响应与生长和繁殖有利条件相关的信号^[43]. 在本研究中,与 *N. viennensis* EN76 (FR773159)有密切亲缘关系的 *Nitrososphaera* Subcluster 1.1 在培养初期土壤中并没有被发现,但是 56 d 培养后 *Nitrososphaera* Subcluster 1.1 被¹³CO₂标记的 *amoA* 基因的相对丰度达到了 10%. 在这项研究中观察到的现象可能表明,当底物变得更加丰富时,一些表型从休眠状态中变得有活性. 在澳大利亚的旱地土壤中,硝化作用没有进行同时也没有发现有活性氨氧化微生物. 然而 *Nitrosopumilus* 和 *Nitrosotalea* 的 *amoA* 基因在加入水之后被¹³CO₂标记,表明有活性且有了明显的硝化作用^[31]. 当环境因子发生变化

时, 例如施加氮肥^[40]或者不同的土地利用方式^[41]会使 AOA 或 AOB 的群落结构发生变化, 从而改变 AOA 或 AOB 的活性。

4 结论

标记培养实验结果表明在 pH = 7.2 的中性紫色土中 AOA 和 AOB 共同推动氨氧化作用的进行。系统发育分析结果表明, 通过培养占有活性优势的 AOA 和 AOB 分别是 *Nitrososphaera* Subcluster 3.2/3.3 和 *Nitrospira* Cluster 3a.2, 与培养初期的氨氧化微生物群落结构不同。

参考文献:

- [1] Gruber N, Galloway J N. An earth-system perspective of the global nitrogen cycle[J]. *Nature*, 2008, **451**(7176): 293-296.
- [2] Ravishankara A R, Daniel J S, Portmann R W. Nitrous oxide (N₂O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century[J]. *Science*, 2009, **326**(5949): 123-125.
- [3] Hyman M R, Arp D J. ¹⁴C₂H₂- and ¹⁴CO₂-labeling studies of the *de novo* synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, **267**(3): 1534-1545.
- [4] 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 [J]. *Environmental Microbiology*, 2005, **7**(12): 1985-1995.
- [5] Leininger S, Urich T, Schloter M, *et al.* Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils [J]. *Nature*, 2006, **442**(7104): 806-809.
- [6] Jia Z J, Conrad R. *Bacteria* rather than *Archaea* dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil [J]. *Environmental Microbiology*, 2009, **11**(7): 1658-1671.
- [7] Allison S M, Prosser J I. Urease activity in neutrophilic autotrophic ammonia-oxidizing bacteria isolated from acid soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1991, **23**(1): 45-51.
- [8] Bruns M A, Stephen J R, Kowalchuk G A, *et al.* Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(7): 2994-3000.
- [9] Ste-Marie C, Paré D. Soil, pH and N availability effects on net nitrification in the forest floors of a range of boreal forest stands [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, **31**(11): 1579-1589.
- [10] Cheng Y, Wang J, Mary B, *et al.* Soil pH has contrasting effects on gross and net nitrogen mineralizations in adjacent forest and grassland soils in central Alberta, Canada[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, **57**: 848-857.
- [11] Suzuki I, Dular U, Kwok S C. Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts [J]. *Journal of Bacteriology*, 1974, **120**(1): 556-558.
- [12] 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.
- [13] Hu B L, Liu S, Wang W, *et al.* pH-dominated niche segregation of ammonia-oxidizing microorganisms in Chinese agricultural soils [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, **90**(1): 290-299.
- [14] 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[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, **9**(9): 2364-2374.
- [15] Nicol G W, Leininger S, Schleper C, *et al.* The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, **10**(11): 2966-2978.
- [16] Prosser J I, Nicol G W. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation[J]. *Trends in Microbiology*, 2012, **20**(11): 523-531.
- [17] Offre P, Prosser J I, Nicol G W. Growth of ammonia-oxidizing archaea in soil microcosms is inhibited by acetylene[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, **70**(1): 99-108.
- [18] Gubry-Rangin C, Nicol G W, Prosser J I. Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, **74**(3): 566-574.
- [19] Di H J, Cameron K C, Shen J P, *et al.* Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils [J]. *Nature Geoscience*, 2009, **2**(9): 621-624.
- [20] Xiang X J, He D, He J S, *et al.* Ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea respond to short-term urea amendment in an alpine grassland[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, **107**: 218-225.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] Radajewski S, McDonald I R, Murrell J C. Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, **14**(3): 296-302.
- [24] 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.
- [25] Wang X L, Chen H, Zhang J B, *et al.* Long-term fertilization effects on active ammonia oxidizers in an acidic upland soil in China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, **84**: 28-37.
- [26] Wang Z H, Meng Y, Zhu-Barker X, *et al.* Responses of nitrification and ammonia oxidizers to a range of background and adjusted pH in purple soils[J]. *Geoderma*, 2019, **334**: 9-14.
- [27] 王梅, 王智慧, 石孝均, 等. 长期不同施肥量对全程氨氧化细菌丰度的影响[J]. *环境科学*, 2018, **39**(10): 4727-4734. Wang M, Wang Z H, Shi X J, *et al.* Long-term fertilization effects on the abundance of complete ammonia oxidizing bacteria (*Comammox Nitrospira*) in a neutral paddy soil [J]. *Environmental Science*, 2018, **39**(10): 4727-4734.
- [28] Jiang X J, Hou X Y, Zhou X, *et al.* pH regulates key players of nitrification in paddy soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, **81**: 9-16.
- [29] 闫小娟. 三种紫色土硝化作用及其硝化微生物的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2016. Yan X J. Research on nitrification and nitrifying microorganisms of three purple soils[D]. Chongqing: Southwest University, 2016.

- [30] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monoxygenase 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] Hu H W, Macdonald C A, Trivedi P, *et al.* Water addition regulates the metabolic activity of ammonia oxidizers responding to environmental perturbations in dry subhumid ecosystems [J]. *Environmental Microbiology*, 2015, **17**(2): 444-461.
- [34] Santoro A E, Francis C A, de Sieyes N R, *et al.* Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, **10**(4): 1068-1079.
- [35] Zhang L M, Hu H W, Shen J P, *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.
- [36] 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.
- [37] Pratscher J, Dumont M G, Conrad R. Ammonia oxidation coupled to CO₂ fixation by archaea and bacteria in an agricultural soil [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**(10): 4170-4175.
- [38] Xia W W, Zhang C X, Zeng X W, *et al.* Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil [J]. *The ISME Journal*, 2011, **5**(7): 1226-1236.
- [39] Zhao J, Wang B Z, Jia Z J. Phylogenetically distinct phylotypes modulate nitrification in a paddy soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, **81**(9): 3218-3227.
- [40] Zhong W H, Bian B Y, Gao N, *et al.* Nitrogen fertilization induced changes in ammonia oxidation are attributable mostly to bacteria rather than archaea in greenhouse-based high N input vegetable soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, **93**: 150-159.
- [41] Bertagnoli A D, McCalmont D, Meinhardt K A, *et al.* Agricultural land usage transforms nitrifier population ecology [J]. *Environmental Microbiology*, 2016, **18**(6): 1918-1929.
- [42] Lennon J T, Jones S E. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, **9**(2): 119-130.
- [43] Kaprelyants A S, Gottschal J C, Kell D B. Dormancy in non-sporulating bacteria [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, **10**(3-4): 271-285.

CONTENTS

Concurrent Measurement of Wet and Bulk Deposition of Trace Metals in Urban Beijing	ZHANG Guo-zhong, PAN Yue-peng, TIAN Shi-li, <i>et al.</i> (2493)
Concentration and Ecological Risk Assessment of Heavy Metals in PM _{2.5} Collected in Urban and Suburban Areas of Beijing	XU Jing, LI Xing-ru, ZHANG Lan, <i>et al.</i> (2501)
Secondary Aerosol Formation in Urban Shanghai: Insights into the Roles of Photochemical Oxidation and Aqueous-Phase Reaction	GAO Jie, QIAO Li-ping, LOU Sheng-rong, <i>et al.</i> (2510)
Secondary Inorganic Pollution Characteristics During Heavy Pollution Episodes of 2017 in Tianjin	XU Hong, XIAO Zhi-mei, CHEN Kui, <i>et al.</i> (2519)
Characterization of PM ₁₀ and PM _{2.5} Source Profiles for Emissions from Nonmetal Mineral Products Manufacturing Processes	ZHAO Xue-yan, YU Gao-feng, WANG Xin-wu, <i>et al.</i> (2526)
Characteristics of Component Particle Size Distributions of Particulate Matter Emitted from a Waste Incineration Plant	YU Zhuo-jun, WU Jian-hui, ZHANG Yu-fen, <i>et al.</i> (2533)
Characteristics and Source Apportionment of Carbon Components in Road Dust PM _{2.5} and PM ₁₀ During Spring in Tianjin Derived by Using the Quadrat Sampling Method	MA Yan, JI Ya-qin, GUO Ji-liang, <i>et al.</i> (2540)
Urban Aerosol Hygroscopicity During Haze Weather	YANG Su-ying, TIAN Zhi-jie, ZHANG Tie-ning, <i>et al.</i> (2546)
Atmospheric Pollution Characteristics and Inhalation Exposure Risk of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in PM _{2.5} at the Ningdong Energy and Chemical Industry Base, Northwest China	LIU Pan-liang, JU Yuan-li, MAO Xiao-xuan, <i>et al.</i> (2556)
Health Benefit Evaluation for PM ₁₀ and PM _{2.5} Pollution Control in Zhengzhou, China, 2014-2016	HAN Shi-jie, WANG Jia, YAN Qi-she, <i>et al.</i> (2565)
Spatial-temporal Distribution of Aerosol Optical Depth and Its Main Influence Types in China During 1990-2017	LIU Ying, LIN Ai-wen, QIN Wen-min, <i>et al.</i> (2572)
Research on the Pollution Characteristics and Causality of Haze-sand Air Pollution in Beijing in Spring	WANG Yao-ting, LI Qing-chun, ZHENG Zuo-fang, <i>et al.</i> (2582)
Vessel Emission Inventories and Emission Characteristics for Inland Rivers in Jiangsu Province	XU Wen-wen, YIN Cheng-qi, XU Xue-ji, <i>et al.</i> (2595)
Atmospheric Nitrogen Dioxide, Nitric Acid, Nitrate Nitrogen Concentrations, and Wet and Dry Deposition Rates in a Double Rice Region in Subtropical China	OUYANG Xiu-qin, WANG Bo, SHEN Jian-lin, <i>et al.</i> (2607)
Characteristics of Stable Isotopes in Precipitation and Moisture Sources in the Headwaters of the Yangtze River	WANG Shao-yong, WANG Qiao-li, WU Jin-kui, <i>et al.</i> (2615)
Historical Trends of Atmospheric Trace Metal Pollution in Northern Guizhou Province as Reconstructed from Alpine Lake Sediments	LIANG Meng-yao, LIU En-feng, ZHANG En-lou, <i>et al.</i> (2624)
Distribution Characteristics of Microplastics in Qingdao Coastal Beaches	LUO Ya-dan, LIN Qian-hui, JIA Fang-li, <i>et al.</i> (2631)
Pollution Characteristics of Microplastics in Migratory Bird Habitats Located Within Poyang Lake Wetlands	LIU Shu-li, JIAN Min-fei, ZHOU Long-yin, <i>et al.</i> (2639)
Use of the Nitrogen/Carbon Ratio (N/C) and Two End-Member Sources Mixing Model to Identify the Origins of Dissolved Organic Matter from Soils in the Water-Level Fluctuation Zones of the Three Gorges Reservoir	JIANG Tao, JOERI Kaal, LIANG Jian, <i>et al.</i> (2647)
Effects of Photosynthesis of Submerged Aquatic Plants on CDOM in a Karst Water System: A Case Study from Xueyu Cave, Chongqing, China	FAN Jia-xin, JIANG Yong-jun, HE Qiu-fang, <i>et al.</i> (2657)
Indicators of Groundwater Evolution Processes Based on Hydrochemistry and Environmental Isotopes: A Case Study of the Dongyuan Drinking Water Source Area in Ji'nan City	ZHANG Ya, SU Chun-li, MA Yan-hua, <i>et al.</i> (2667)
Water Quality Analysis and Health Risk Assessment for Groundwater at Xiangshui, Chongzuo	ZHOU Jin-mei, JIANG Zhong-cheng, XU Guang-li, <i>et al.</i> (2675)
Chemical Characteristics of Groundwater and Material Sources Analysis in Buckwheat Field, Yunnan Province	ZHANG Yong, GUO Chun-qing, ZHU Yan-guang, <i>et al.</i> (2686)
C and N Transport Flux and Associated Changes of Water Quality Parameters from a Multiscale Subtropical Watershed in the Poyang Lake Area	LU Yao, GAO Yang, JIA Jun-jie, <i>et al.</i> (2696)
Pollutant Transport Analysis and Source Apportionment of the Entire Non-point Source Pollution Process in Combined Sewer Systems	FANG Jin-xiu, XIE Wen-xia, ZHOU Yu-xi, <i>et al.</i> (2705)
Nitrogen Removal Efficiencies from Road Runoff by Dry Grass Swales with a Shallow Substrate Layer	DUAN Jin-kai, LI Tian, ZHANG Jia-wei (2715)
Migration Characteristics of Manganese During Rainfall Events and Its Impacts on Water Quality in a Drinking Water Source Reservoir	DENG Li-fan, HUANG Ting-lin, LI Nan, <i>et al.</i> (2722)
Potential for Phosphorus Uptake by Bed Sediments and Its Response to Carbon Additions in the Shiwuli River, Chaohu Lake Basin	LI Ru-zhong, BAO Qin, ZHANG Rui-gang, <i>et al.</i> (2730)
Sources and Distribution of Phosphorus in Sediments of the Jimpen Reservoir	MAO Xue-jing, HUANG Ting-lin, LI Nan, <i>et al.</i> (2738)
Water Quality Characteristics and Distribution of Bacterial Communities During Thermal Stratification in the Miyun Reservoir	WANG Yu-bing, WANG Xiao-yan, PANG Shu-jiang, <i>et al.</i> (2745)
Relationship Between the Vertical Distribution of Nutrients and Bacterial Community Structures in Sediment Interstitial Waters of Stratified Reservoirs with Different Water Temperatures	WANG Shen, ZHANG Si-si, XU You, <i>et al.</i> (2753)
Accumulation Characteristics and Release Regularity of Nutrients in Sediments of a Surface-flow Constructed Wetland After Long-term Operation	ZHU Yi-meng, JIANG Cui-ling, ZHU Li-qin, <i>et al.</i> (2764)
Application of Goethite Modified Biochar for Arsenic Removal from Aqueous Solution	ZHU Si-hang, ZHAO Jing-jing, YIN Ying-jie, <i>et al.</i> (2773)
Effects and Mechanisms of Methyl Orange Removal from Aqueous Solutions by Modified Rice Shell Biochar	SHI Yue-yue, SHAN Riu, YUAN Hao-ran (2783)
Performance and Membrane Fouling Properties in an Anaerobic Membrane Bioreactor for Salty Wastewater	YAN Huan-xi, XU Zhen-yu, JIN Chun-ji, <i>et al.</i> (2793)
Pollution Characteristics and Enhanced Removal of Organic Phosphorus in Effluent from a Wastewater Treatment Plant	WANG Xiao-dong, WANG Zi-wen, CHEN Ming-fei, <i>et al.</i> (2800)
Effects of Alkalinity on Partial Nitrification in a Zeolite Sequencing Batch Reactor	WANG Rui-xin, CHEN Jing, WANG Xiao-jun, <i>et al.</i> (2807)
Effects of the Physical Structure of Activated Sludge on Respiration Processes	GUO Yao, LI Zhi-hua, YANG Cheng-jian, <i>et al.</i> (2813)
Performance of an Aerobic Granular Reactor Treating Biogas Slurry from Pig Farm	LIAO Jie, YE Jia-qi, ZENG Zhi-chao, <i>et al.</i> (2821)
Spatial-temporal Characteristics and Driving Factors of Greenhouse Gas Emissions from Rivers in a Rapidly Urbanizing Area	LIU Ting-ting, WANG Xiao-feng, YUAN Xing-zhong, <i>et al.</i> (2827)
Influences of Biochar on Pollutant Removal Efficiencies and Nitrous Oxide Emissions in a Subsurface Flow Constructed Wetland	DENG Chao-ren, LIANG Yin-kun, HUANG Lei, <i>et al.</i> (2840)
Effects of the Veterinary Antibiotic Sulfamethazine on N ₂ O Emissions and the Associated Microbiological Mechanism in a Rice Field	WU Jie, LI Zhi-lin, XU Jia-ying, <i>et al.</i> (2847)
Effects of Different Levels of Nitrogen Fertilization on Soil Respiration Rates and Soil Biochemical Properties in an Alfalfa Grassland	HU Wei, ZHANG Ya-hong, LI Peng, <i>et al.</i> (2858)
Spatial Distribution and Risk Assessment of Heavy Metals in Soils from a Typical Urbanized Area	HE Bo, ZHAO Hui, WANG Tie-yu, <i>et al.</i> (2869)
Accumulation of Heavy Metals in Agricultural Soils and Crops from an Area with a High Geochemical Background of Cadmium, Southwestern China	LIU Yi-zhang, XIAO Tang-fu, XIONG Yan, <i>et al.</i> (2877)
Spatial Distribution Characteristics and Source Apportionment of Soil Heavy Metals in Chinese Wolfberry Land Based on GIS and the Receptor Model	BAI Yi-ru, ZHANG Xing, ZHAO Yun-peng, <i>et al.</i> (2885)
Spatial Distribution and Pollution Assessment of As at a Small Scale in Agricultural Soils of the Karst Region	WANG Hua, LIU Xiu-ming, LIU Fang, <i>et al.</i> (2895)
Soil Aggregate Stability and Its Stoichiometric Characteristics in <i>Robinia pseudoacacia</i> Forest within Different Vegetation Zones on the Loess Plateau, China	QU Qing, XU Hong-wei, WU Xuan, <i>et al.</i> (2904)
Straw Returning Plus Nitrogen Fertilizer Affects the Soil Microbial Community and Organic Carbon Mineralization in Karst Farmland	XU Xue-chi, SU Yi-rong, WANG Gui-hong, <i>et al.</i> (2912)
Effects of Biochar Application and Ageing on the Adsorption of Antibiotics in Purple Soil	YIN Wen-min, GUAN Zhuo, LIU Chen, <i>et al.</i> (2920)
Ammonia Oxidation in a Neutral Purple Soil Measured by the ¹⁵ N-DNA-SIP Method	LIU Tian-lin, WANG Zhi-hui, YAN Xiao-juan, <i>et al.</i> (2930)
Effects of Silver Nanoparticles and Silver Ions on Soil Nitrification Microorganisms and Ammonification	WU Ling-li, ZHANG Xu, SHU Kun-hui, <i>et al.</i> (2939)
Insight into the Process of Mn-ANAMMOX in Soils of Agricultural Drainage Ditches	CHEN Shi, LI Zheng-kui, QIN Yun-bin, <i>et al.</i> (2948)
Effects of Different Concentrations of Tetracycline in Sludge on Ammonia Oxidizers During Vermicomposting	WU Ying, HUANG Kui, XIA Hui, <i>et al.</i> (2954)