

研究报告

锡林河流域 *Nitrospira* 的生态位分化及环境驱动力于景丽^{*1,2,3} 夏晶晶^{1,2,3} 李传虹^{1,2,3} 张少华^{1,2,3} 李新^{1,2,3} 芦燕^{1,2,3} 希尼尼根^{*4}

1 蒙古高原生态与资源利用教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010021

2 内蒙古自治区环境污染控制与废物资源化重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010021

3 内蒙古大学生态与环境学院 内蒙古 呼和浩特 010021

4 内蒙古农业大学兽医学院 内蒙古 呼和浩特 010018

摘要:【背景】硝化螺菌属(*Nitrospira*)驱动的全程及半程硝化过程在全球氮循环中发挥关键作用,但关于锡林河流域 *Nitrospira* 的生态位分化和环境驱动力及其可能发挥的全程硝化功能尚不明晰。

【目的】阐明锡林河流域不同生境 *Nitrospira* 的生态位分化及环境驱动力,探究可能的全程硝化功能。【方法】利用 16S rRNA 基因高通量测序及生物信息学分析研究不同生境沉积物及土壤 *Nitrospira* 类群的组成、丰度、生态位分化及其环境驱动力,并预测其全程硝化功能。【结果】共检测到 9 类 *Nitrospira*, 其中 *Nitrospira* 1、2、4 主要分布在旱生环境,与沙粒、水分含量、pH 及氨氮间存在负相关关系,与硝态氮、可溶性盐、总有机碳、全氮、全磷、粉粒和粘粒含量间存在正相关关系;*Nitrospira* 5、6、7、8、9 主要分布在水生及湿生环境,与粉粒等存在负相关关系,与沙粒等存在正相关关系(*Nitrospira* 9 与氨氮存在负相关除外);*Nitrospira* 3 优先分布在河床中心水生环境,仅与沙粉粒含量存在正相关关系,与其他环境因子存在负相关关系。【结论】锡林河流域 *Nitrospira* 类群有明显的生态位分化和广泛的生境适应性。*Nitrospira* 1、2、4 最适于营养相对丰富的旱生环境;*Nitrospira* 5、6、7、8、9 最适于相对寡营养的水生及湿生环境;*Nitrospira* 3 偏爱粉沙、自由水及低氨寡营养水生环境。粉粒含量、可溶性盐和氨氮是导致 *Nitrospira* 类群生态位分化及空间分异的最主要环境驱动力。推测 *Nitrospira* 3 很可能是驱动全程硝化的完全氨氧化菌(comammox),而 *Nitrospira* 1、2、4、5、6、7、8、9 是否为 Comammox 有待探究。

关键词: 锡林河流域, 硝化螺菌属, 生态位分化, 环境驱动力, 完全氨氧化菌

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41361053, 31660724); Natural Science Foundation of Inner Mongolia (2011MS0603, 2016MS0331, 2015MS0306); National College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (201810126043)

***Corresponding authors:** E-mail: YU Jing-Li: hot-yjl@163.com; Xininigen: nndxnng@163.com

Received: 12-06-2019; **Accepted:** 13-01-2020; **Published online:** 21-02-2020

基金项目: 国家自然科学基金(41361053, 31660724); 内蒙古自然科学基金(2011MS0603, 2016MS0331, 2015MS0306); 国家级大学生创新创业训练计划(201810126043)

***通信作者:** E-mail: 于景丽: hot-yjl@163.com; 希尼尼根: nndxnng@163.com

收稿日期: 2019-06-12; **接受日期:** 2020-01-13; **网络首发日期:** 2020-02-21

Niche differentiation of *Nitrospira* and associated environmental driving forces in Xilin river basin

YU Jing-Li^{*1,2,3} XIA Jing-Jing^{1,2,3} LI Chuan-Hong^{1,2,3} ZHANG Shao-Hua^{1,2,3} LI Xin^{1,2,3}
LU Yan^{1,2,3} Xininigen^{*4}

1 Ministry of Education Key Laboratory of Ecology and Resource Use of the Mongolia Plateau, Hohhot, Inner Mongolia 010021, China

2 Inner Mongolia Key Laboratory of Environmental Pollution Control & Waste Resource Reuse, Hohhot, Inner Mongolia 010021, China

3 School of Ecology and Environment, Inner Mongolia University, Hohhot, Inner Mongolia 010021, China

4 College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China

Abstract: [Background] Complete and incomplete nitrification driven by *Nitrospira* plays a key role in global nitrogen cycle, but little is known about the niche differentiation of *Nitrospira*, and associated environmental driving forces for *Nitrospira*'s niche separation and as well as possible functions like complete nitrification driven by *Nitrospira* in Xilin river basin. [Objective] To reveal the niche differentiation of *Nitrospira* and associated environmental driving forces, and deciphering the possible functions like complete nitrification driven by *Nitrospira*. [Methods] Based on high throughput sequencing of 16S rRNA gene with bioinformatics analysis, the compositions and abundance of sediment/soil *Nitrospira* populations were analyzed. Meanwhile, their niche differentiation and associated environmental driving forces were characterized so as to predict their potential complete nitrification. [Results] Nine *Nitrospira* genera were detected, of which *Nitrospira* 1, 2 and 4 were dominated in xeric environment, which were negatively correlated with sand, water content, pH and ammonia nitrogen (AM) while positively correlated with nitrate nitrogen (NR), dissolved salt (DS), total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN), total phosphorus (TP), silt and clay contents. In comparison, *Nitrospira* 5, 6, 7, 8 and 9 were dominated in aquatic and hygic environments, positively correlated with sand content (except *Nitrospira* 9 negatively correlated with AM), etc. and negatively correlated with silt content, etc. Interestingly, *Nitrospira* 3 was preferentially distributed in the center of the river bed with aquatic environment, only positively correlated with sand and silt contents, but negatively correlated with the other environmental factors. [Conclusion] There was obvious niche differentiation of *Nitrospira* populations with a wide range of habitat adaptability in Xilin river basin. *Nitrospira* 1, 2 and 4 were most suitable to colonize xeric environment with relatively rich nutrients, positively driven by silt content, etc. Whereas *Nitrospira* 5, 6, 7, 8 and 9 were most suitable to inhabit relatively oligotrophic aquatic and hygic environments, positively driven by sand content, etc. *Nitrospira* 3 preferred silt, free water and low ammonia in oligotrophic aquatic environments, positively driven by only sand and silt contents. Briefly, silt content, dissolved salt (DS) and ammonia nitrogen (AM) were the main environmental driving forces for niche differentiation of *Nitrospira* groups. So i) *Nitrospira* 3 was presumed as probable comammox; ii) the other *Nitrospira* populations like 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 and 9 belong to comammox remains to be further discussed.

Keywords: Xilin river basin, *Nitrospira*, Niche differentiation, Environmental driving forces, Comammox

锡林河是内蒙古高原典型草原区重要的生态功能单元和中国北方生态屏障^[1]的生命线。近年来,锡林河湿地萎缩及草原沙化问题日趋严重^[2]。微生物作为生物地球化学循环的发动机^[3],其菌群组成、丰度及分布动态是生态系统结构及功能变

化的敏感预警者^[4]。硝化螺菌属(*Nitrospira*)驱动的半程硝化或亚硝酸盐氧化(incomplete nitrification or nitrite oxidization)^[5-9]及全程硝化(complete nitrification)^[10-18]是全球氮素生物地球化学循环的重要组成部分。迄今,发现驱动全程硝化的微生物

均为 *Nitrospira* 系统发育谱系 II^[10-18], 包含 A 和 B 两个分支。驱动全程硝化的微生物被称为完全氨氧化菌(complete ammonia oxidizer, comammox)^[10-18]。*Nitrospira* 类群广泛分布于水体^[19-25]、湿地^[19,24-26]、陆地^[27-30]等环境。相当多的研究证实全程硝化 *Nitrospira* 适合于底物受限的寡营养和缺氧环境^[12-25]。其中, 低氨和高氨环境是辨别全程硝化 *Nitrospira* 和半程硝化 *Nitrospira* 生态位分化的关键要素^[12-25], 而亚硝酸盐浓度有无则是区分半程硝化 *Nitrospira* 和全程硝化 *Nitrospira* 生态位分化的决定性因素^[8-9]。另外, 盐度和溶解氧含量也是区分半程硝化 *Nitrospira* 和全程硝化 *Nitrospira* 生态位分化的重要因素, 低盐低溶氧环境更适合于全程硝化 *Nitrospira*, 而高盐高溶氧环境更适合于半程硝化 *Nitrospira*^[12-25]。尽管 pH、盐度等是驱动细菌群落空间异质性的的重要因素^[31], 但关于细菌群落中 *Nitrospira* 功能群的生态位分化以及环境驱动力和可能的全程硝化功能等问题尚不明晰。本文基于 16S rRNA 基因高通量测序及生物信息学分析研究锡林河流域水生、湿生、旱生环境中沉积物/土壤 *Nitrospira* 类群的组成、丰度、空间分异及生态位分化, 结合环境因子探究 *Nitrospira* 类群生态位分化的环境驱动力问题, 结合文献资料探讨并预测 *Nitrospira* 类群可能的全程硝化功能, 为全程硝化及半程硝化 *Nitrospira* 类群的生态位鉴别及后续准确有效跟踪 Comammox *Nitrospira* 类群提供科学依据, 为今后解析湿地萎缩和草原沙化关联 *Nitrospira* 类群的生态适应机制提供研究思路, 最终为推动中国北部边疆的生态屏障的生态文明建设和绿色发展奠定科学基石。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Fast DNA[®] SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals 公司; QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN 公司。QuantiFluor[™]-ST 蓝色荧光定量系统, Promega 公司。

1.2 样带选择、采样点设置及理化特性

锡林河流域中游位于中国科学院内蒙古草原生态系统定位站西侧(43°36′–44°29′N, 115°32′–117°12′E)。该区属温带半干旱大陆性季风气候, 多年平均气温-0.4 °C, 年平均降水量 336.9 mm, 其中 5–8 月份降水量占全年的 51%–89%。水生和湿生植被主要为灯芯草(*Juncus effusus*)和鹅绒委陵菜(*Potentilla anserina*), 旱生植被主要为羊草(*Leymus chinensis*)和大针茅(*Stipa grandis*)。河床中心沉积物及河漫滩土壤以沙粒为主, 河床边缘沉积物以沙粉粒为主, 阶地草原土壤沙、粉、粘粒含量适中^[32]。采样时间为 2017 年 7 月上旬, 选择锡林河水生环境 R、河漫滩湿生环境 W、阶地旱生环境 T 依次划分为河床中心样带 R1 (6 个亚带: R11、R12、R13、R14、R15、R16)、河床边缘样带 R2 (4 个亚带: R21、R22、R23、R24)、牛轭湖样带 R3 (5 个亚带: R31、R32、R33、R34、R35)、低河漫滩样带 W1 (5 个亚带: W11、W12、W13、W14、W15)和高河漫滩样带 W2 (3 个亚带: W21、W22、W23)、低阶地样带 T1 (6 个亚带: T11、T12、T13、T14、T15、T16)和高阶地样带 T2 (5 个亚带: T21、T22、T23、T24、T25) (图 1)。34 个沉积物/土壤样品均按样带进行布点, 样带中心间距 50 m, 用沉积物采样器及土钻采集相应的表层 0–10 cm 沉积物及土壤。每个亚带按照 S 型进行 5 点取样(即 5 个采样重复), 混合后制备成 1 个样品(约 1 kg)置于无菌塑料袋中, 24 h 内用冰盒运到实验室。按照四分法分取样品, 部分样品-80 °C 保存供分子生物学分析, 其余土样在室内风干、研磨、过筛供理化因子检测。沉积物/土壤样品的理化特性检测按照《土壤农业化学分析方法》^[33]进行。沙粒(sand)含量从 T1 样带最低的 59.97% 到 R1 样带最高的 99.98%, 含水量(water content, WC)从 T2 样带最低的 14.36%到 R1 样带次低的 17.84%再到 R3 样带最高的 24.14%, pH 从 R1 样带最低的 7.91 到 W1 样带最高的 8.97, 氨态氮(ammonia nitrogen, AM)从 R1 样带最低的 1.00 mg/kg 到 T 样带次低的 5.38%再到 R2 样带最高的 39.47 mg/kg。

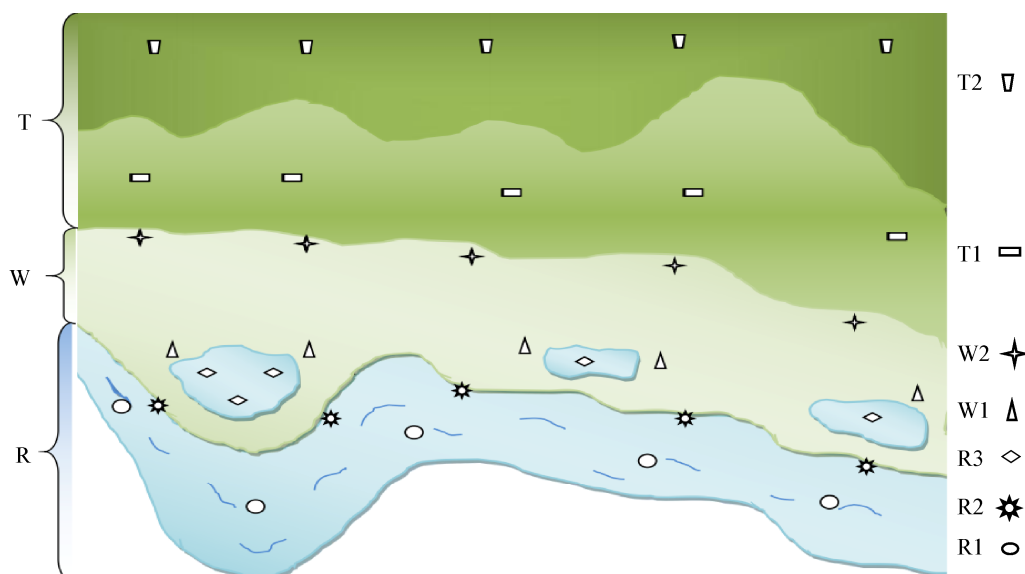


图 1 基于不同的生境划分样带

Figure 1 Design of sampling zones based on different habitats

注: R: 水生样带; W: 湿生样带; T: 旱生样带.

Note: R: Aquatic transects; W: Hygric transects; T: Xeric transects.

总体上, R1 是高沙低氮的寡营养生境, W 是沙粒含量较高的中等偏寡营养生境, T 则是粉粒含量偏多的相对富营养生境。

1.3 沉积物/土壤 DNA 的提取、PCR 和高通量测序

沉积物/土壤样品充分混匀后按照 Fast DNA[®] SPIN Kit for Soil 说明提取微生物基因组总 DNA。利用 16S rRNA 基因 V3-V4 区引物进行 PCR 扩增。正向、反向引物分别 338F (5'-ACTCCTACGGGAGG CAGCA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCT AAT-3')^[32]。每个样品加 10 bp 标签序列以示区别。PCR 反应体系(20 μ L): DNA 模板(10 ng/ μ L) 1 μ L, *FastPfu* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.4 μ L, 5 \times FastPfu 缓冲液 4 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 正、反向引物(5 μ mol/L)各 0.4 μ L, 超纯水补至 20 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min^[34]。所有样品的 PCR 产物经纯化和定量后送往北京百迈客生物科技有限公司的 Illumina MiSeq PE300 测序平台进行高通量测序。

1.4 测序数据分析

使用 Trimmomatic 软件将测序接头、标签和前引物序列去除后得到有效序列, 进一步修剪、去除非特异性扩增片段、模糊碱基、单碱基高重复区以及长度过短的序列获得优化序列, 使用 FLASH 软件将双端测序的序列进行拼接, 最小重叠区长度设置为 10 bp, 得到长度大约 468 bp 的序列, 使用 UPARSE 软件在 97%的相似度水平上进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类分析同步剔除嵌合体。利用 RDP classifier 对每条序列进行分类学注释, 相似性达到 95%的 OTU 归为同一个细菌属, 再将每条序列与 SILVA 数据库(SSU128)进行序列比对(比对阈值 70%), 获得具体的分类学名称, 分析每个细菌属在总细菌组成中的相对丰度, 从全部细菌属中抽提硝化螺菌属(*Nitrospira*)及其在全部细菌属水平(genus level)上的相对丰度信息, 进行后续的统计分析^[34]。

1.5 数据的统计分析

采用 R 语言相关矩阵可视化包 ggcorrplot 进行 Pearson 相关性分析。用 Excel 2010 进行基本

图形绘制。用百迈客生物云计算平台(BMKCloud)内置 R 语言绘制 Heatmap 图。用 CANOCO 4.5.1 (Biometris-Plant Research International, Wageningen, Netherlands)进行 PCA (principal component analysis) 主成分分析,通过 RDA (redundancy analysis)冗余分析来研究 *Nitrospira* 类群丰度和环境因子的相关性。

2 结果与分析

2.1 高通量测序结果分析

7 个样带 34 个样品共获得 3 115 787 条优质序列 (43 830 个 OTU), 平均长度 459 bp。共划分为 625 个细菌属, 9 个为 *Nitrospira* 属, 隶属于 *Nitrospirae* 门 *Nitrospira* 纲 *Nitrospirales* 目 *Nitrospiraceae* 科, 依次命名为 *Nitrospira* 1、*Nitrospira* 2、*Nitrospira* 3、*Nitrospira* 4、*Nitrospira* 5、*Nitrospira* 6、*Nitrospira* 7、*Nitrospira* 8 和 *Nitrospira* 9, 其最高相对丰度依次为 2.34%、0.76%、1.71%、0.29%、0.75%、0.73%、0.16%、0.44%、0.26%。相比于全部细菌属中最优势的 *g_uncultured Chitinophagaceae*, 在 R16 的最高相对丰度为 21.45%。依据高通量测序细菌划分的 5 个等级[极低($\leq 0.20\%$), 低($0.20\% - 0.50\%$), 中等($0.50\% - 1.00\%$), 高($1.00\% - 1.50\%$), 极高($\geq 1.50\%$)]^[31], *Nitrospira* 4、7、8、9 属于低丰度细菌, *Nitrospira* 2、5、6 属于中等丰度细菌, *Nitrospira* 1、3 属于高等丰度细菌。总体上, 9 类 *Nitrospira* 为锡林河流域常见的细菌。最优势的 9 类 *Nitrospira* 中 *Nitrospira* 1、2、3、5、6、7、9 是不可培养的, 说明锡林河流域沉积物和土壤中大多数 *Nitrospira* 是不可培养的。

2.2 *Nitrospira* 类群的组成、丰度、生态位分化及空间分异

由图 2 可知, 9 个 *Nitrospira* 类群组成及丰度各异, 7 个样带 *Nitrospira* 类群的累积相对丰度依次为 1.30%–1.75% (R1)、0.69%–0.82% (R2)、0.50%–1.85% (R3)、0.87%–2.70% (W1)、0.91%–3.02% (W2)、1.71%–3.45% (T1)、2.90%–3.93% (T2), 沿着 R1、R2、R3、W1、W2、T1、T2 样带 9 类 *Nitrospira*

总体呈现先降低后增加的分布趋势, 在 R2 样带的分布最低, T1 和 T2 样带的分布最高。具体而言, *Nitrospira* 1、2 和 4 主要分布在 W2、T1 和 T2 样带, 峰值依次出现在 T21 (2.34%)、T14 (0.76%)、T14 (0.29%), 说明湿偏旱生及早生环境是 *Nitrospira* 1、2 和 4 最适合的生境和分布热区; *Nitrospira* 5、6、8 和 9 主要分布在 W1 样带, 峰值依次出现在 W14 (0.73%)、W15 (0.73%)、W15 (0.44%)、W15 (0.26%), 说明湿生环境是 *Nitrospira* 5、6、8 和 9 最适合的生境和分布热区; 其次, *Nitrospira* 5 和 6 是 R2 样带较为优势的微生物, 说明水生环境也是 *Nitrospira* 5 和 6 较为适合的生境和分布热区; *Nitrospira* 7 是 R2 样带最优势的微生物, 同时为 W1 样带次优势菌, 说明水生及湿偏水生环境是 *Nitrospira* 7 最适合的生境和分布热区; 有趣的是, *Nitrospira* 3 沿着水生、湿生、旱生环境的分布规律极为特殊, 在水生环境 R1 样带分布的最多, 在旱生环境 T2 样带、湿偏旱生的 W2 样带以及水生的 R3 样带分布的较多, 而在水生的河床边缘 R2 样带少有分布, 总体而言, 河床中心的 R1 样带是 *Nitrospira* 3 最适合的生境, 主峰值出现在 R11 (1.71%); 高阶地 T2 样带是 *Nitrospira* 3 较适合的生境, 次峰值出现在 T25 (1.25%)。不同生境沉积物/土壤中 *Nitrospira* 类群的累积相对丰度依次为 4.46% (R1)、6.36% (R2)、20.91% (W1)、7.30% (W2)、2.46% (T1)、1.61% (T2)。综上, 9 类 *Nitrospira* 具有明显的生态位分化和空间分异特征, *Nitrospira* 3 和 *Nitrospira* 7 最适于水生环境, *Nitrospira* 5、6、8 和 9 最适于湿生环境, *Nitrospira* 1、2 和 4 最适合于偏旱生及早生环境。

2.3 *Nitrospira* 类群的生境多样性分析

Heatmap (图 3A)显示, 水生环境 R1、R2、R3 样带和湿偏水生环境 W1 样带相似性较高聚为一类, 而湿偏旱生环境 W2 样带及早生环境 T1 和 T2 样带相似性较高聚为一类, 表明 *Nitrospira* 类群具有明显的生态位分化和空间分异特征。PCA (图 3B) 显示出和 Heatmap 基本一致的结果, 即水生环境

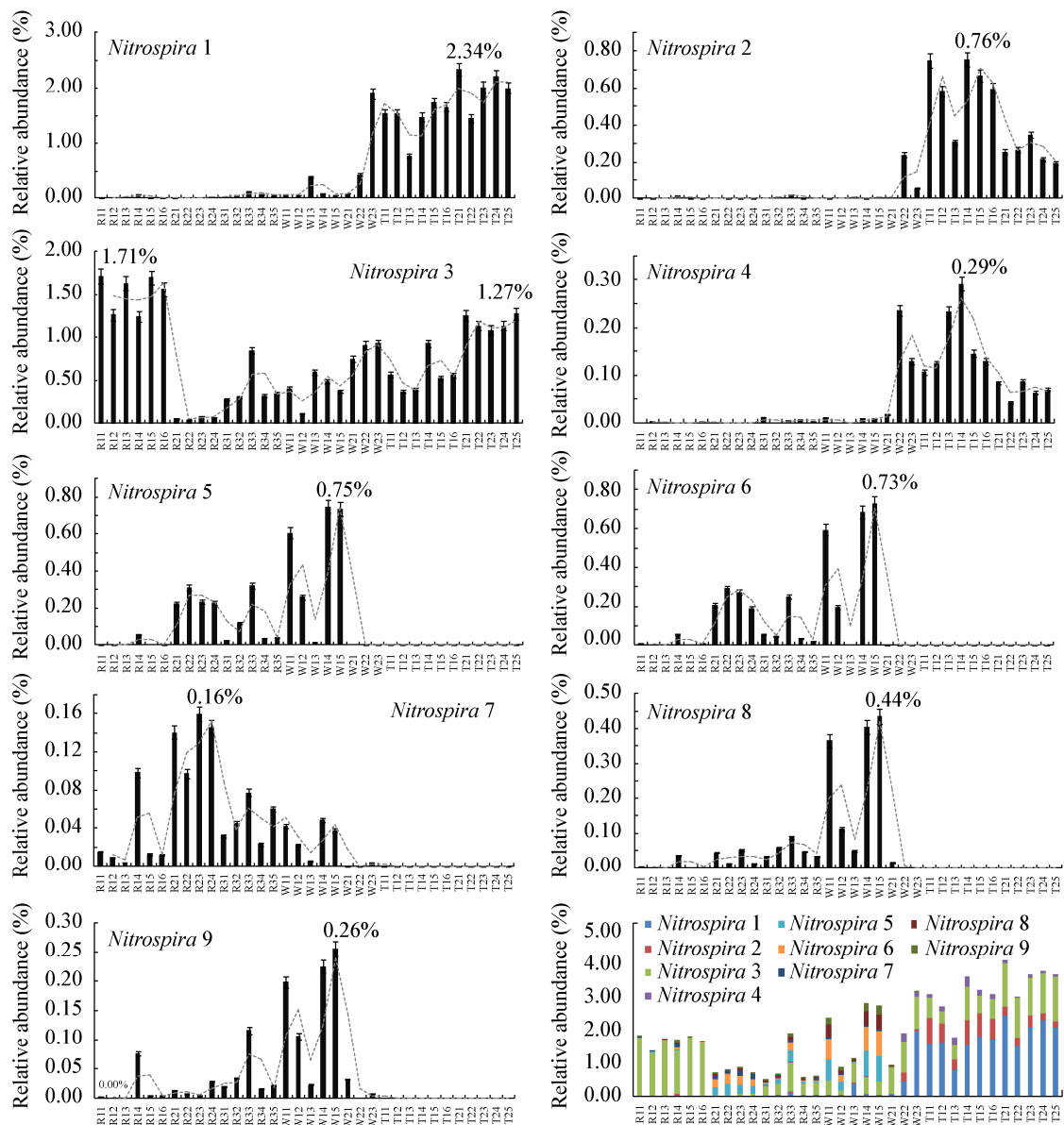


图2 *Nitrospira* 类群的空间分布及热区

Figure 2 Hotspot and spatial distribution of *Nitrospira* populations

注: 曲线表示 *Nitrospira* 沿着水生(R)、湿生(W)、旱生(T)环境梯度相对丰度变化的趋势线; 图中数字表示该菌的最大相对丰度数值。

Note: The curve representing the trend line of *Nitrospira*'s relative abundance change along the gradient from aquatic, hygic to xeric environments; The figure showing the maximum relative abundance of single *Nitrospira*.

R1、R2、R3 样带和湿生环境 W 样带 *Nitrospira* 类群间距离较近、相似度较高, 而偏旱生环境 W2 样带及旱生环境 T 样带 *Nitrospira* 类群间距离较近、相似度较高。由图 3B 还可以看出, PCA1 与 PCA2 在第一轴和第二轴的方差解释百分比分别为 68.4%

和 22.7%, 第一轴和第二轴的累计方差解释百分比高达 91.1%, 说明第一轴和第二轴可有效代表多轴的累计方差解释率。综上, 不同生境 7 个样带 34 个样品中 *Nitrospira* 类群具有明显的生态位分化和空间分布异质性。

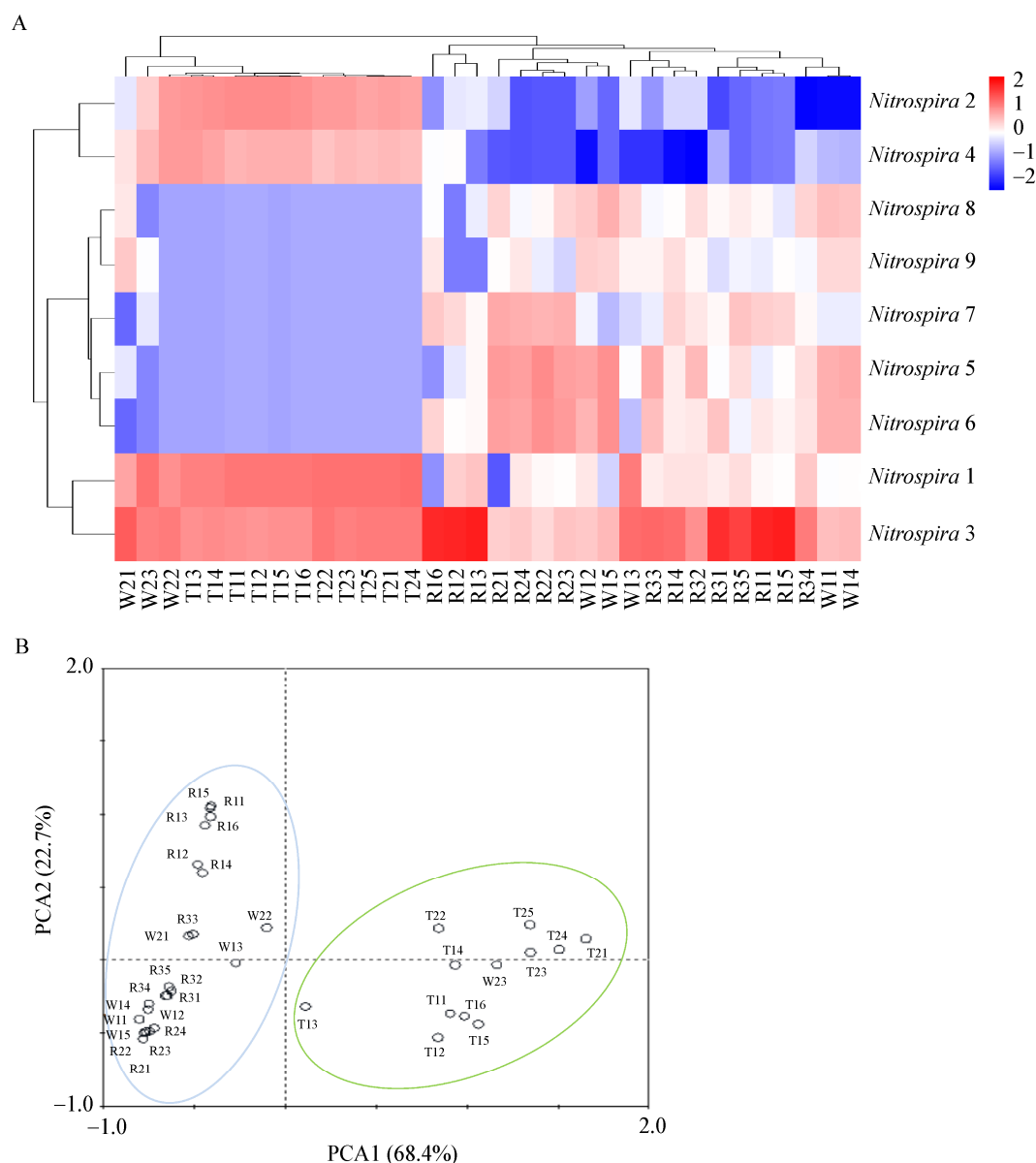


图3 *Nitrospira* 类群的热图(A)和主成分分析(B)

Figure 3 Heatmap (A) and principal component analysis (PCA) (B) of *Nitrospira* populations

2.4 *Nitrospira* 类群生态位分化的环境驱动力

由 RDA (图 4A) 可知, *Nitrospira* 1、2 和 4 主要分布在营养相对丰富的 W2、T1 和 T2 样带, 由粉粒(silt)含量、粘粒(clay)含量、总有机碳(total organic carbon, TOC)、全氮(total nitrogen, TN)、全磷(total phosphorus, TP)、溶解性盐(dissoluble salt, DS)、硝态氮(nitrate nitrogen, NR)等正向驱动, 由沙粒含量、含水量(WC)、氨态氮(AM)、pH 等环境因子负

向驱动。*Nitrospira* 5、6、7、8 和 9 主要分布在相对寡营养的 R2、R3、W1 样带, 由粉粒含量、粘粒含量、总有机碳(TOC)、全氮(TN)、全磷(TP)、溶解性盐(DS)、硝态氮(NR)等负向驱动, 由沙粒含量、含水量(WC)、氨态氮(AM)、pH 等环境因子正向驱动。有趣的是, *Nitrospira* 3 既不同于喜欢养分的早生型 *Nitrospira* 1、2 和 4, 也不同于喜欢氨态氮 AM 和高 pH 的湿生型兼水生型 *Nitrospira* 5、6、7、8

和 9, *Nitrospira* 3 只对河床中心 R1 样带的沙粒含量稍有偏好。

RDA (图 4A) 结果显示, 第 1 排序轴与第 2 排序轴解释度分别为 63.2% 和 20.3%。与第 1 排序轴关联度较高的环境因子依次有粉粒含量 ($R=0.905\ 4$)、沙粒含量 ($R=-0.876\ 0$)、全磷 (TP) ($R=0.861\ 9$)、含水量 (WC) ($R=-0.842\ 4$)、全氮 (TN) ($R=0.753\ 0$)、硝态氮 (NR) ($R=0.751\ 2$)、粘粒含量 ($R=0.739\ 0$)、溶解性盐 (DS) ($R=0.674\ 6$)、总有机碳 (TOC) ($R=0.566\ 5$)、氨态氮 (AM) ($R=-0.439\ 7$) 等; 与第 2 排序轴关联度较高的环境因子依次有溶解性盐 (DS) ($R=-0.715\ 5$)、总有机碳 (TOC) ($R=-0.615\ 3$)、氨态氮 (AM) ($R=-0.607\ 8$)、pH ($R=-0.595\ 2$)、全氮 (TN) ($R=-0.499\ 2$)、全磷 (TP) ($R=-0.428\ 2$)、硝态氮 (NR) ($R=-0.406\ 2$) 等。与第 1 排序轴 *Nitrospira* 类群关联度较高的环境因子依次为粉粒含量 ($R=0.870\ 0$)、沙粒含量 ($R=-0.841\ 7$)、全磷 (TP) ($R=0.828\ 1$)、含水量 (WC) ($R=-0.809\ 4$)、全氮 (TN) ($R=0.723\ 6$)、硝态氮 (NR) ($R=0.721\ 8$)、粘粒含量 ($R=0.710\ 1$)、溶解性盐 (DS) ($R=0.648\ 2$)、总有机碳 (TOC) ($R=0.544\ 4$)、氨态氮 (AM) ($R=-0.422\ 5$) 等; 与第 2 排序轴 *Nitrospira* 类群关联度较高的环境因子依次为溶解性盐 (DS) ($R=-0.676\ 5$)、总有机碳 (TOC) ($R=-0.581\ 8$)、氨态氮 (AM) ($R=-0.574\ 7$)、pH ($R=-0.562\ 8$)、全氮 (TN) ($R=-0.472\ 0$)、全磷 (TP) ($R=-0.404\ 9$)、硝态氮 (NR) ($R=-0.384\ 1$) 等。值得注意的是, 第 3 排序轴与第 4 排序轴解释度虽然低到 3.5% 和 1.6%, 但是氨态氮 (AM) 与第 4 排序轴的关联度高达 $R=-0.508\ 9$, 仅次于第 2 排序轴 $R=-0.607\ 8$; 同时, 氨态氮 (AM) 与第 2、4、1、3 排序轴 *Nitrospira* 类群的关联度分别为 $-0.574\ 7$ 、 $-0.426\ 8$ 、 $-0.422\ 5$ 、 $-0.202\ 4$ 。总之, 氨态氮 (AM) 作为全程硝化和半程硝化 *Nitrospira* 类群的底物, 氨态氮 (AM) 的影响是多维度的。

通过方差分解 (图 4B), 11 个已知环境因子变异的总解释度为 85.8%, 其中粉粒 (silt)、溶解性盐 (DS)、氨氮 (AM) 的解释度分别为 55.9%、15.6%、4.7%, 三者的蒙特检验 $P<0.01$ 。

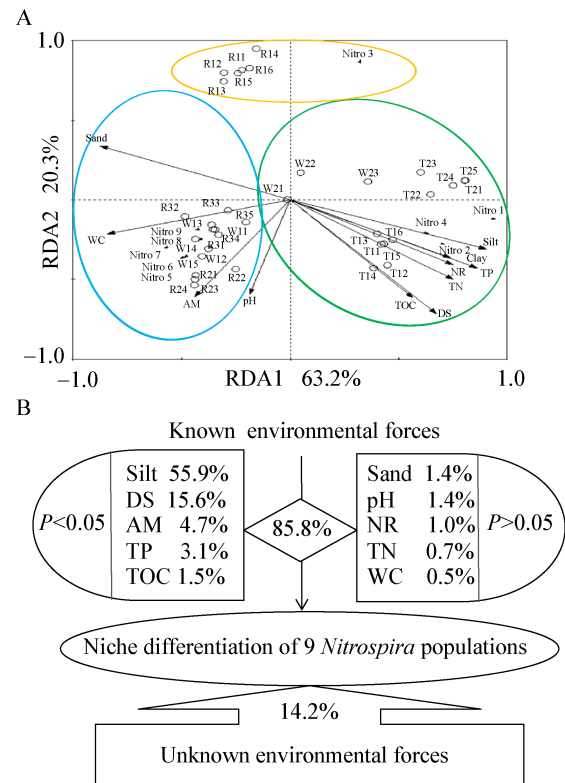


图 4 *Nitrospira* 类群与环境因子的冗余分析(A)及已知和未知环境驱动力的方差分解(B)

Figure 4 Redundancy analysis (RDA) of *Nitrospira* populations and environmental factors (A) as well as variation partitioning between known and unknown environmental driving forces (B)

Note: Nitro 1: *Nitrospira* 1; Nitro 2: *Nitrospira* 2; Nitro 3: *Nitrospira* 3; Nitro 4: *Nitrospira* 4; Nitro 5: *Nitrospira* 5; Nitro 6: *Nitrospira* 6; Nitro 7: *Nitrospira* 7; Nitro 8: *Nitrospira* 8; Nitro 9: *Nitrospira* 9.

由 Pearson 相关性分析 (表 1) 可知, *Nitrospira* 1、2 和 4 与硝态氮 (NR) (0.75、0.74、0.59)、溶解性盐 (DS) (0.72、0.67、0.58)、总有机碳 (TOC) (0.61、0.58、0.52)、全氮 (TN) (0.76、0.78、0.63)、全磷 (TP) (0.87、0.74、 -0.62)、粉粒含量 (0.89、0.82、0.77)、粘粒含量 (0.71、0.93、0.79) 等环境因子间呈现极显著 ($P<0.01$) 和显著 ($P<0.05$) 正相关关系, 例外的是 *Nitrospira* 4 与全磷 (TP) 间呈现极显著负相关关系; 与沙粒含量 (0.85、0.89、0.81)、含水量 (WC) (0.76、0.67、0.52)、pH (0.08、0.17、0.08)、氨态氮 (AM) (0.34、0.31、0.32) 等呈现负相关关系, 其中 *Nitrospira* 1、2 和 4 与沙粒含量、含水量 (WC) 间负相关关系达到

表 1 沉积物/土壤理化因子与硝化螺菌属(*Nitrospira*)之间的皮尔逊相关性分析

Table 1 Pearson correlations between sediment/soil physicochemical factors and *Nitrospira*

硝化螺菌属	沙粒	水分含量	pH	氨氮	硝氮	可溶性盐	总有机碳	全氮	全磷	粉粒	粘粒
<i>Nitrospira</i> genera	Sand	WC		AM	NR	DS	TOC	TN	TP	Silt	Clay
<i>Nitrospira</i> 1	-0.85**	-0.76**	-0.08	-0.34*	0.75**	0.72**	0.61**	0.76**	0.87**	0.89**	0.71**
<i>Nitrospira</i> 2	-0.89**	-0.67**	-0.17	-0.31	0.74**	0.67**	0.58**	0.78**	0.74**	0.82**	0.93**
<i>Nitrospira</i> 3	0.02	-0.47**	-0.57**	-0.72**	-0.14	-0.42*	-0.37*	-0.20	-0.10	0.02	-0.09
<i>Nitrospira</i> 4	-0.81**	-0.52**	-0.08	-0.32	0.59**	0.58**	0.52**	0.63**	-0.62**	0.77**	0.79**
<i>Nitrospira</i> 5	0.39*	0.50**	0.46**	0.25	-0.38*	-0.10	-0.15	-0.28	-0.28	-0.38*	-0.38*
<i>Nitrospira</i> 6	0.38*	0.48**	0.44**	0.24	-0.37*	-0.10	-0.17	-0.29	-0.28	-0.37*	-0.37*
<i>Nitrospira</i> 7	0.48**	0.45**	0.02	0.80**	-0.18	-0.21	-0.32	-0.41*	-0.46**	-0.50**	-0.41*
<i>Nitrospira</i> 8	0.34	0.45**	0.51**	0.01	-0.40*	-0.11	-0.09	-0.22	-0.21	-0.32	-0.34
<i>Nitrospira</i> 9	0.37*	0.48**	0.50**	-0.02	-0.47**	-0.16	-0.11	-0.25	-0.25	-0.35*	-0.38*

注：*：在 0.05 水平(双侧)上显著相关；**：在 0.01 水平(双侧)上显著相关。

Note: *: Correlation was significant at the 0.05 level (2-tailed); **: Correlation was significant at the 0.01 level (2-tailed).

极显著水平($P<0.01$)，*Nitrospira* 1 与氨态氮(AM)间负相关关系达到极显著水平($P<0.01$)，*Nitrospira* 1、2 和 4 与 pH 间负相关关系未达到显著水平($P>0.05$)。综上，*Nitrospira* 1、2、和 4 喜欢养分及粉粒和粘粒含量高的旱生土壤环境，抵御高水沙、高氨和高 pH 的水生及湿生环境。

Nitrospira 5、6、7、8 和 9 与环境因子之间的正负相关性恰好与 *Nitrospira* 1、2 和 4 相反。即 *Nitrospira* 5、6、7、8 和 9 与沙粒含量、含水量(WC)、pH、氨态氮(AM)等呈现正相关关系(*Nitrospira* 9 与 AM 存在负相关除外)，且大多数达到极显著($P<0.01$)和显著($P<0.05$)水平，说明 *Nitrospira* 5、6、7、8 和 9 喜欢高水沙、高氨和高 pH 环境；与硝态氮(NR)、溶解性盐(DS)、总有机碳(TOC)、全氮(TN)、全磷(TP)、粉粒含量、粘粒含量等环境因子间全部呈现负相关关系，且部分达到极显著($P<0.01$)和显著($P<0.05$)水平，说明 *Nitrospira* 5、6、7、8 和 9 抵御硝态氮(NR)、溶解性盐(DS)、总有机碳(TOC)、全氮(TN)、全磷(TP)、粉粒含量、粘粒含量等环境(表 1)。综上，*Nitrospira* 5、6、7、8 和 9 喜欢高水沙、高氨和高 pH 的水生及湿生沉积物/土壤环境，抵御养分及粉粒和粘粒含量高的旱生土壤环境。

与上述 8 类 *Nitrospira* 不同，*Nitrospira* 3 除与沙粒含量和粉粒含量之间呈现不显著的正相关关系($P>0.05$)外，与其他 9 个环境因子之间均呈现负相关关系，且与含水量(WC)、pH、氨态氮(AM)之

间达到极显著负相关水平($P<0.01$)，说明 *Nitrospira* 3 稍稍偏好沙粒和粉粒，喜欢少水、低氨、低 pH 环境。另外，*Nitrospira* 3 与溶解性盐(DS)、总有机碳(TOC)之间达到显著负相关水平($P<0.05$)，说明 *Nitrospira* 3 喜欢低盐、低碳环境。

综上，Pearson 相关性分析结果和 RDA 分析结果基本一致。

3 讨论

3.1 硝化螺菌属(*Nitrospira*)的生态学研究方法学解析

据报道，大多数的硝化螺菌属 *Nitrospira* 是不可培养的，少数 *Nitrospira* 分离株生长缓慢且难于在实验室保存^[35]。本研究发现的 9 类 *Nitrospira* 中有 7 类是不可培养的，与文献报道的大多数 *Nitrospira* 是不可培养的研究结果^[35]一致。不依赖于培养的新型分子生态技术为 *Nitrospira* 功能群的多样性研究提供了契机^[15,36]。尽管细菌 16S rRNA 基因自身多拷贝特征产生的基因组内多样性会高估细菌多样性^[37]，但 16S rRNA 基因测序一直被认为是研究细菌多样性的金标准^[13,38]。van Kessel 等基于 16S rRNA 基因系统发育分析证实两种氨氧化 *Nitrospira* 均为 *Nitrospira* 谱系 II，与广泛存在于土壤、地下水、污水处理厂和饮用水中的 *Nitrospira* 核酸序列相似性>99%^[13]，说明 16S rRNA 基因用于研究 *Nitrospira* 的多样性是可行的。研究表明，在 0.05 水平下 V1-V3 区的基因组内多样性可被高估

6.0, 而 V4–V5 区仅被高估 1.6^[37]。本研究选择 16S rRNA 基因 V3–V4 区介于 V1–V3 区和 V4–V5 区之间, 所以基因组内多样性不会太高^[37]。因此, 选择 16S rRNA 基因 V3–V4 区能较为客观地反映 *Nitrospira* 等细菌多样性。

3.2 *Nitrospira* 类群的生态位分化

Nitrospira 广泛分布于水体^[12,19-25]、湿地^[19,24-26]、陆地^[12,27-30]等环境, 这和本研究不同 *Nitrospira* 类群适宜不同生境的结果是一致的。*Nitrospira* 的生境多样性与遗传多样性密不可分, 例如 *Nitrospira* 至少存在 I、II、III、IV、V、VI 等 6 个系统发育谱系^[12,38], 各个谱系显示出不同的生境偏好^[12,16,38], 详见表 2^[38]。迄今发现驱动全程硝化的微生物均为 *Nitrospira* 谱系 II, 包括 A 和 B 两个分支。本研究基于 16S rRNA 基因高通量测序虽不能证实 *Nitrospira* 是属于谱系 II 还是其他谱系, 但根据文献报道的 *Nitrospira* II 具有区别于其他谱系的生态位习性——Comammox *Nitrospira* 更适于低氨负荷、低氧或缺氧(hypoxia)的寡营养生境^[12-25], 这为本研究 *Nitrospira* 生态位分化的结果提供了科学支撑。

3.3 *Nitrospira* 类群的环境驱动力

本研究发现在河床中心沙粒含量极高的湍流沉积物中存在 *Nitrospira*, 这与快速砂滤器^[21]及长江河口沉积物^[22]中存在 Comammox *Nitrospira* 的研究结果具有一致性。特别有趣的是, 定殖在河床中心沙粒中的 *Nitrospira* 还在湿偏旱生及早生环境中 有较为优势的分布, 这与陆地环境的研究结果^[27-30]

是一致的。可见, 河床中心沉积物与高河漫滩、高阶地等土壤环境共同满足了该菌所需要的沙粉粒等基质条件, 这与文献报道的 Comammox *Nitrospira* 属于表面附着型微生物的结论^[21,39-40]相吻合。此外, 河床中心的 *Nitrospira* 抗拒高氨及高溶解性盐环境并抵御丰富的有机质, 这与文献报道的 Comammox *Nitrospira* 是喜欢低氨负荷及淡水环境的自养型微生物的结论相一致^[12-25]。综上, 推测河床中心沉积物中的 *Nitrospira* 具有 Comammox 功能。

定殖在湿生环境中的 *Nitrospira* 虽然表现出寡营养特性, 但这些菌与底物氨均存在正相关关系, 不符合 Comammox *Nitrospira* 喜欢低氨负荷环境及其与氨具有高亲和力的研究证据^[12-25]。定殖在旱生环境中的 *Nitrospira* 不喜欢高含水量及高 pH、喜欢低氨负荷环境, 但这些菌与底物氨均存在负相关关系, 与粉粒及养分等均存在正相关关系, 与陆生环境中可能存在的 Comammox *Nitrospira* 的研究结果^[27-30]相一致, 而湿生和旱生环境中的 *Nitrospira* 是否为 Comammox 有待进一步研究。这为后续有针对性的设计、实验采集样品及 Comammox *Nitrospira* 的靶向跟踪提供科学参考。值得注意的是, 已知 Comammox *Nitrospira* 是一类表面附着型的微生物, 虽然生长缓慢但节能和高产的优势吸引了多领域学者的广泛关注。研究证实 pH^[31]和盐度^[32]是驱动微生物群落结构的关键环境因子, 但本研究通过方差分解发现粉粒含量、可溶性盐和氨氮对 *Nitrospira* 类群的变异分别有 55.9%、15.6%、4.7%

表 2 不同谱系 *Nitrospira* 的生境特征及氮循环功能^[38]

Table 2 Habitat characteristics and nitrogen cycle functionings of different *Nitrospira* lineages^[38]

硝化螺菌谱系	土壤	淡水系统	海洋及高盐系统	地下水系统	人工系统	地热	氮循环功能
<i>Nitrospira</i> lineages	Soil	Freshwater systems	Marine and hypersaline systems	Groundwater systems	Engineered systems	Geothermal systems	Nitrogen cycle functionings
I	√	√		√	√		Nitrite oxidation
II	√	√		√	√	√	Nitrite oxidation and comammox
III	√			√			Nitrite oxidation
IV			√				Nitrite oxidation
V	√				√		Nitrite oxidation
VI						√	Nitrite oxidation
Others	√		√	√		√	Nitrite oxidation

注: √表示硝化螺菌属特定的谱系在生境中有分布。

Note: √ indicated that the certain lineages of *Nitrospira* were distributed in the habitats.

的解释度,初步证实粉粒含量、可溶性盐和氨氮是导致 *Nitrospira* 类群变异的最主要环境驱动力。

4 结论

本研究首次从基质、底物、营养等多环境因子研究完全及不完全硝化 *Nitrospira* 的生态位分化及环境驱动力。本研究初步证实 *Nitrospira* 具有明显的生态位分化和广泛的生境适应性, *Nitrospira* 1、2、4 是旱生生境的优势菌,由沙粒、水分含量、pH 及氨氮负向驱动,由硝态氮、可溶性盐、总有机碳、全氮、全磷、粉粒和粘粒含量正向驱动(*Nitrospira* 4 与全磷存在负相关关系除外)。 *Nitrospira* 5、6、7、8、9 主要为水生、湿生生境的优势菌,由沙粒、水分含量、pH 及氨氮正向驱动(*Nitrospira* 9 与氨氮存在负相关除外),由硝态氮、可溶性盐、总有机碳、全氮、全磷、粉粒和粘粒含量负向驱动。 *Nitrospira* 3 是河床中心水生生境的最优势菌,在高阶地旱生环境也有较多分布,仅由沙粒和粉粒正向驱动,其他环境因子负向驱动。 *Nitrospira* 3 喜欢偏粉沙偏自由水的低氨和寡营养环境,极度抗拒高氨、高 pH、高盐、高有机质等环境,是典型的自养型微生物、极有可能为驱动全程硝化的 Comammox *Nitrospira*, 而 *Nitrospira* 1、2、4、5、6、7、8、9 是否为 Comammox 值得深入探究。粉粒含量、可溶性盐 DS 和氨氮 AM 是导致 *Nitrospira* 类群生态位分化的最主要环境驱动力。

REFERENCES

- [1] Li XB, Tian MR, Wang H, et al. Development of an ecological security evaluation method based on the ecological footprint and application to a typical steppe region in China[J]. *Ecological Indicators*, 2014, 39: 153-159
- [2] Tong C, Wu J, Yong S, et al. A landscape-scale assessment of steppe degradation in the Xilin River Basin, Inner Mongolia, China[J]. *Journal of Arid Environments*, 2004, 59(1): 133-149
- [3] Fierer N, Leff JW, Adams BJ, et al. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(52): 21390-21395
- [4] Matulich KL, Martiny JBH. Microbial composition alters the response of litter decomposition to environmental change[J]. *Ecology*, 2015, 96(1): 154-163
- [5] Watson SW, Bock E, Valois FW, et al. *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium[J]. *Archives of Microbiology*, 1986, 144(1): 1-7
- [6] Lüscher S, Wagner M, Maixner F, et al. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(30): 13479-13484
- [7] Koch H, Lüscher S, Albertsen M, et al. Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(36): 11371-11376
- [8] Maixner F, Wagner M, Lüscher S, et al. Environmental genomics reveals a functional chlorite dismutase in the nitrite-oxidizing bacterium 'Candidatus *Nitrospira defluvi*'[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3043-3056
- [9] Maixner F, Noguera DR, Anneser B, et al. Nitrite concentration influences the population structure of *Nitrospira*-like bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(8): 1487-1495
- [10] Dong XS, Wang ZH, Huang XR, et al. Recent discovery in nitrification: one-step nitrification and complete ammonia oxidizing microorganisms[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(1): 345-352 (in Chinese)
董兴水, 王智慧, 黄学茹, 等. 硝化作用研究的新发现: 单步硝化作用与全程氨氧化微生物[J]. *应用生态学报*, 2017, 28(1): 345-352
- [11] Xu JN, Mao YP. From canonical nitrite oxidizing bacteria to complete ammonia oxidizer: discovery and advances[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(4): 879-890 (in Chinese)
徐建宇, 毛艳萍. 从典型硝化细菌到全程氨氧化微生物: 发现及研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(4): 879-890
- [12] Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 504-509
- [13] van Kessel MAHJ, Speth DR, Albertsen M, et al. Complete nitrification by a single microorganism[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 555-559
- [14] Santoro AE. The do-it-all nitrifier[J]. *Science*, 2016, 351(6271): 342-343
- [15] Pinto AJ, Marcus DN, Ijaz UZ, et al. Metagenomic evidence for the presence of comammox *Nitrospira*-like bacteria in a drinking water system[J]. *mSphere*, 2015, 1(1): e00054-15
- [16] Koch H, Van Kessel MAHJ, Lüscher S. Complete nitrification: insights into the ecophysiology of comammox *Nitrospira*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(1): 177-189
- [17] Pjevac P, Schaubberger C, Poghosyan L, et al. *AmoA*-targeted polymerase chain reaction primers for the specific detection and quantification of comammox *Nitrospira* in the

- environment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1508
- [18] Kits KD, Sedlacek CJ, Lebedeva EV, et al. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle[J]. *Nature*, 2017, 549(7671): 269-272
- [19] Shi GS, Bai L, Zhou LG. Research advances of complete ammonia oxidizers and its nitrification[J]. *Journal of Jilin Jianzhu University*, 2018, 35(5): 57-63 (in Chinese)
史国帅, 白莉, 周立光. 完全氨氧化菌及其硝化作用的研究进展[J]. *吉林建筑大学学报*, 2018, 35(5): 57-63
- [20] Wang YL, Ma LP, Mao YP, et al. Comammox in drinking water systems[J]. *Water Research*, 2017, 116: 332-341
- [21] Fowler SJ, Palomo A, Dechesne A, et al. Comammox *Nitrospira* are abundant ammonia oxidizers in diverse groundwater-fed rapid sand filter communities[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(3): 1002-1015
- [22] Yu CD. The enrichment culture and diversity analysis of complete ammonia oxidizers from sediments of Yangtze Estuary[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China Normal University, 2018 (in Chinese)
余晨笛. 长江河口沉积物全程氨氧化微生物的富集及多样性分析[D]. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 2018
- [23] Yu CD, Hou LJ, Zheng YL, et al. Evidence for complete nitrification in enrichment culture of tidal sediments and diversity analysis of clade a comammox *Nitrospira* in natural environments[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(21): 9363-9377
- [24] Wang Y, Sheng HF, He Y, et al. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(23): 8264-8271
- [25] Zhang HX, Zheng SL, Ding JW, et al. Spatial variation in bacterial community in natural wetland-river-sea ecosystems[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2017, 57(6): 536-546
- [26] Wang M, Wang ZH, Shi XJ, 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 (in Chinese)
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
- [27] Molina V, Dorador C, Fernández C, et al. The activity of nitrifying microorganisms in a high-altitude Andean wetland[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2018, 94(6), doi: 10.1093/femsec/fiy062
- [28] Daebeler A, Bodelier PL, Yan Z, et al. Interactions between Thaumarchaea, *Nitrospira* and methanotrophs modulate autotrophic nitrification in volcanic grassland soil[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(12): 2397-2410
- [29] Zhao WY, Wang ZH, Cao YQ, et al. Response of nitrification and nitrifiers to different nitrogen sources in an alkaline purple soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2018, 55(2): 479-489 (in Chinese)
赵伟烨, 王智慧, 曹彦强, 等. 石灰性紫色土硝化作用及硝化微生物对不同氮源的响应[J]. *土壤学报*, 2018, 55(2): 479-489
- [30] Hu HW, He JZ. Comammox—a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2017, 17(12): 2709-2717
- [31] Campbell BJ, Kirchman DL. Bacterial diversity, community structure and potential growth rates along an estuarine salinity gradient[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(1): 210-220
- [32] Wang P, Chen B, Zhang H. High throughput sequencing analysis of bacterial communities in soils of a typical Poyang Lake wetland[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(5): 1650-1658 (in Chinese)
王鹏, 陈波, 张华. 基于高通量测序的鄱阳湖典型湿地土壤细菌群落特征分析[J]. *生态学报*, 2017, 37(5): 1650-1658
- [33] Lu RK. Analytical Methods of Soil and Agro-Chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000 (in Chinese)
鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000
- [34] Lu Y, Zeng J, Zhao J, et al. Spatial characteristics of denitrifying bacterial communities in different habitats from Typical Steppe[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(4): 707-720 (in Chinese)
芦燕, 曾静, 赵吉, 等. 典型草原区不同生境反硝化菌群的空间特征[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(4): 707-720
- [35] Daims H, Wagner M. *Nitrospira*[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(5): 462-463
- [36] Palomo A, Pedersen AG, Fowler SJ, et al. Comparative genomics sheds light on niche differentiation and the evolutionary history of comammox *Nitrospira*[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(7): 1779-1793
- [37] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969
- [38] Daims H, Lückner S, Wagner M. A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria[J]. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(9): 699-712
- [39] Selje N, Simon M. Composition and dynamics of particle-associated and free-living bacterial communities in the Weser estuary, Germany[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2003, 30(3): 221-237
- [40] Bidle KD, Fletcher M. Comparison of free-living and particle-associated bacterial communities in the chesapeake bay by stable low-molecular-weight RNA analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(3): 944-952