

土地利用变化对土壤硝化及氨氧化细菌区系的影响

杨莉琳¹, 毛任钊¹, 刘俊杰², 刘小京^{1*}

(1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心, 农业水资源重点实验室, 石家庄 050021; 2. 河北省沧州市南大港管理区农业科学研究所, 沧州 061103)

摘要: 以青藏高原相邻的原始森林、天然草原和农田土壤为研究对象, 分别采用室内培养法和 nested PCR-DGGE 技术, 对比研究了这 3 个生态系统的土壤硝化势、硝态氮浓度以及土壤氨氧化细菌 (AOB) 菌群区系。结果表明, 农田土壤的硝化势和硝态氮 (NO_3^- -N) 浓度显著高于相邻的草原和森林土壤, 硝化势分别是森林和草原土壤的 9 倍和 11 倍, NO_3^- -N 是农田土壤无机氮 (N_{min}) 的主要成分, 占无机氮的 70% ~ 90%。铵态氮 (NH_4^+ -N) 则是森林和草原土壤中主要的无机氮形态。原始森林和天然草原间的硝化势和硝态氮浓度没有显著差异。原始森林的土壤 AOB 菌群数量、多样性及均匀度最低。天然草原生态系统转换为农田后, 土壤 AOB 菌群的多样性和均匀度显著降低, 但是农田土壤的 AOB 菌群结构仍与其前身草原生态系统有较高的相似性。原始森林的 AOB 菌群数量、多样性及均匀度最低直接导致了其硝化势最低; 农田土壤的硝化势和硝态氮浓度最高意味着农田生态系统中优势 AOB 的活性最高。以上结果表明, 土地利用变化导致土壤氮素内循环及其关键微生物 AOB 的多样性与活性均发生显著变化, 这些变化会影响土壤环境质量以及生态系统的持续与稳定。

关键词: 土地利用变化; 活性氮; 硝化势; 氨氧化细菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)11-3455-06

Impact of Land-use Type Changes on Soil Nitrification and Ammonia-Oxidizing Bacterial Community Composition

YANG Li-lin¹, MAO Ren-zhao¹, LIU Jun-jie², LIU Xiao-jing¹

(1. Key Laboratory of Agricultural Water Resources, Center for Agricultural Research Resources, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Shijiazhuang 050021, China; 2. Nandagang Institute for Agricultural Research of Hebei, Cangzhou 061103, China)

Abstract: A comparative study was conducted to determine nitrification potentials and ammonia-oxidizing bacterial (AOB) community composition in 0-20 cm soil depth in adjacent native forest, natural grassland, and cropland soils on the Tibetan Plateau, by incubation experiment and by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA, respectively. Cropland has the highest nitrification potential and nitrate concentration among the three land-use types (LUT), approximately 9 folds and more than 11 folds than that of the forests and grasslands, respectively. NO_3^- -N accounted for 70% -90% of inorganic N in cropland soil, while NH_4^+ -N was the main form of inorganic N in forest and grassland soils. Nitrification potentials and nitrate concentrations showed no significant difference between native forest and grassland soils. The native forest showed the lowest nitrification potentials and the lowest AOB diversity and community composition among the three LUT. Conversions from natural grasslands to croplands remarkably decreased the AOB diversity and composition, but croplands remain high similarity in AOB community composition compared with grasslands. The minimal and the lowest diversity of AOB in native forests directly resulted to the lowest nitrification potentials compared to natural grasslands and croplands. From the fact of the highest nitrification potentials and nitrate concentrations in croplands indicated that there were the most substantial AOB with higher activity and priority. The results provide evidence that changes of land-use type can affect both soil nitrogen internal cycling process, the diversity, community and activity of AOB, which further affect soil environment quality and the long-term sustainability of ecosystems.

Key words: land-use type change; reactive nitrogen; nitrification potential; ammonia-oxidizing bacteria (AOB)

人类对自然界过度干预是造成全球气候和生态环境变化的一个重要原因。近年来, 国内外科学家就人为活动或自然事件引起的土地利用变化对活性氮库及其循环方面已做了大量的研究^[1-5]。研究表明, 自然生态系统森林和草原转换为农田 30 ~ 50 a 后, 土壤理化性质、微生物群落特征及生物活性显著改变^[1, 6, 7], 土壤有机质、N、P、K 等养分都会发生不同

程度的损失, 特别是土壤活性 N 周转加快^[3-8]。但迄今为止, 土地利用变化与土壤圈活性氮库及影响氮素转化的土壤微生物的关系仍不清楚。这是因为

收稿日期: 2010-06-20; 修订日期: 2010-11-22

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (D2009001446)

作者简介: 杨莉琳 (1967 ~), 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为环境生态与养分循环, E-mail: yanglin@sjziam.ac.cn

* 通讯联系人, E-mail: xjliu@sjziam.ac.cn

土壤氮素内循环是一个由土壤微生物参与的生物化学过程,特别是土壤氨氧化细菌(AOB),直接参与了土壤有机质分解过程中N素从 NH_4^+ 氧化成 NO_2^- 的转化,影响着土壤的硝化进程^[9,10]. AOB能够在休眠状态下长时间存活,但细胞活性很低或没有活性.传统的土壤培养方法(MPN)对它无效^[11~14].因而对AOB的研究长期处于“瓶颈”状态.近年来,分子生物学技术的发展为识别土壤微生物区系和种属提供了成熟而可靠的方法.它成功地解决了自然界土壤中绝大多数微生物难以培养的缺陷,已被广泛运用于土壤微生物生态学的研究^[15~17].

青藏高原平均海拔超过4 000 m,总面积122万 km^2 ,约占全国总面积的12.8%.拥有世界上最大的自然地理单元和最独特的自然生态环境,是全球受工业化污染最少的一方净土.青藏高原既是南亚、东南亚地区的“江河源”和“生态源”,也是中国乃至东半球气候的“启动器”和“调节区”.近半个世纪以来,随着人口的增加和经济的发展,历史悠久保存完好的生态系统不断受到人类活动的影响和干扰,一些原始森林和天然草原被开垦种植转化为农田.因此,研究这一特殊区域的土地利用变化对土壤活性氮库及土壤微生物的影响,对理解我国和世界气候和生态环境的变化具有重要意义.

本研究以青藏高原3个相邻的原始森林、天然草原和由草原转换而成的受人工频繁扰动的农田生态系统为对象,对比分析其土壤硝化势以及影响土壤活性氮库和硝化势的土壤氨氧化细菌(AOB)的区系差异,从分子或基因水平揭示土地利用变化引起土壤活性氮库差异的微生物分子生态学机制,以期为我国生态脆弱区不同土地利用方式的调控与管理,维护土壤环境质量,恢复生态平衡提供理论指导具有重要参考作用.

1 研究区域概况

研究区域选择在西藏东南部的尼洋河谷周围(N: $29^\circ 44' 20'' \sim 29^\circ 45' 17''$, E: $94^\circ 11' 58'' \sim 94^\circ 17' 15''$).该区域基本代表了中国青藏高原典型的自然生态系统(原始森林和天然草原)和受人类农业活动频繁扰动的农田生态系统.气候特征为大陆性气候,属高原亚寒带干旱、半干旱气候类型,常年平均气温 8.6°C .夏季温凉短暂,7~8月最高温度 $22 \sim 23^\circ\text{C}$,年平均最高温度 15.9°C .冬季严寒漫长,多大风,最低温度 $-4.5 \sim -5.2^\circ\text{C}$,在12月~翌年1月.年平均最低温度 3.7°C ,寒冷干旱,全年无绝对

无霜期.年降雨量670 mm,蒸发量1 723.5 mm. $\geq 5^\circ\text{C}$ 、 $\geq 10^\circ\text{C}$ 和 $\geq 15^\circ\text{C}$ 积温分别为2 850、2 272和475 $^\circ\text{C}$,持续日数分别为235、160和30 d,年日照时数2 059.6 h.

原始森林海拔3 059 m,林地坡度 $>30^\circ$,主要林种为高山栎,成林时间大约66~80 a.草原生态系统海拔3 093 m,至少有100 a以上的历史,属于温性草原类.地上植被主要为禾草类,植被组成和草层结构比较简单.青藏高原农田生态系统海拔3 053 m,前身为灌草地,耕作历史46 a.主要作物为小麦、青稞(裸大麦),连作现象严重,即使换茬,仅限于小麦-青稞.常年平均产量 $1.25 \sim 1.75 \text{ t/hm}^2$.管理粗放,基本不施肥.即使施用,也是以少量有机肥(畜粪)为主,年平均施用量仅为 6 t/hm^2 左右.偶尔施用尿素,年平均施用量大约 70 kg/hm^2 左右,地表撒施.灌溉为大水漫灌、串灌.被采样的3个不同土地利用方式相互紧邻,自然地理气候特征相近.近20年原始森林和天然草原均没有受到明显的人为农业扰动.

2 研究方法

2.1 土壤样品采集和处理

土壤样品采集于2004年3月,采样位点用GPS定位,对于原始森林和天然草原,分别选择5块条件一致面积大约为 $25 \text{ m} \times 20 \text{ m}$ 的样地,样地之间距离不小于10 m,每块样地中按照“之”字型采集至少5个样点.在原始森林生态系统中,采样点距树干至少1 m以上,以确保土样不受树木微环境的影响.对于农田生态系统,随机选取5个农户的田块,这些田块管理方式基本一致,代表了当地典型的农田管理方式.农田与原始森林和天然草原相互紧邻.在每一田块内按照“之”字型采集至少5个样点.

在每一个采样位点附近1 m的范围内,用直径12 cm的土钻随机采取至少10钻土.采样前手工移除土壤表面覆盖的枯枝落叶或作物残茬等,按每20 cm一层分层次取样,西藏高原的土层较薄,一般最深取至80~120 cm.土样分装在8号自封口袋中并标识密封.相同土层的土样装入同一密封袋中并充分混匀,形成一个混合样.土样立即冷藏于冰盒内运回实验室作相应处理.

取回的新鲜土样在实验室内分析前进行预处理,用手工去除肉眼可见的石砾、植物残根、土壤动物和有机碎屑物等,立即过4 mm筛.过筛后的鲜土分三部分处理,一部分立即用于土壤含水量和无机氮含量和硝化势的测定^[16,17],另一部分自然风干用

于土壤理化性质的测定,剩余的鲜土置于-20℃冰箱中保存用于分子生物学分析^[9]。

2.2 土壤碳、氮含量、土壤硝化势及 pH 的测定

称取 12 g 过筛后的新鲜土样,用 100 mL 0.01 mol·L⁻¹ CaCl₂ 溶液振荡 1 h 浸提,过滤。浸提液上流动自动分析仪测定土壤 NO₃⁻-N 和 NH₄⁺-N;同时,另取 35~40 g 土样立即测定土壤含水量^[2]。土壤有机质和全氮的测定分别采用重铬酸钾法和凯氏定氮法。称取 15 g 过 4 mm 筛的鲜土样,放入 250 mL 振荡瓶中,加入一定量的 1.5 mmol/L NH₄⁺ 和 1 mmol/L PO₄³⁻ 的混合液,同时做另一份不加 NH₄⁺ 的去离子水的土样作为对照,用透气不透水膜封口。在 25℃ 下 180 r/min 摇床上黑暗振荡培养 24 h 后过滤^[17]。滤液中 NO₃⁻-N 用自动流动分析仪测定。土壤 pH 用无 CO₂ 去离子水浸提,水:风干土的比例对农田和草原土壤为 2.5:1 (质量浓度),森林土壤为 3:1 (质量浓度)。

2.3 土壤氨氧化细菌的 PCR-DGGE 分析

2.3.1 土壤中微生物 DNA 的提取与土壤 16S rRNA 基因 V2 和 V3 区的扩增

土壤微生物 DNA 提取用试剂盒 FastDNA SPIN

(Bio 101, Inc, La Jolla, California, US) 方法。称取-20℃ 下冷冻的新鲜土样 0.5 g,按照试剂盒说明的标准方法提取土壤微生物总 DNA。

以试剂盒提取的基因组 DNA 稀释 10~50 倍,作为聚合酶链式反应 (PCR) 的模板,使用 Bio-Rad 生产的 PCR 仪,采用 nested PCR,首次 PCR 采用对多数细菌的 16Sr RNA 基因 V2 和 V3 区具有特异性的通用引物对 27f-1492r。序列为 27f: AGAGTTTG (A/C) TCCTGGCTCAG; 1492r: TACGG (C/T) TACCTTGTTACGACTT。二次 PCR 采用对绝大多数氨氧化细菌的 16S rRNA 基因特异性的通用引物对 CTO189f-CTO654r^[9],其序列为,CTO654r: CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC; CTO189f A/B-GC: CCGCCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGGGCAGGGGGG GAGRAAAGCAGGGGATCG; CTO189f C-GC: CGCCC GCCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGGGCAGGGGGGA GGAAAGTAGGGGATCG; (序列中下划线为 GC 夹),最终扩增产物片断长约 465bp。PCR 的反应体系用量和反应条件见表 1。土壤微生物基因组 DNA 提取产物及 2 次 nested PCR 产物分别用 1.0%、1.2% 和 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,EB(溴化乙锭)染色检测。

表 1 Nested PCR 实验的反应条件
Table 1 Summary of the nest PCR conditions

反应液体积/μL	模板体积/μL	5 μmol·L ⁻¹ 引物/μL	2.5 U Taq 酶量/μL	扩增程序
第一次 PCR, 25	0.3~0.4	2	0.3~0.4	94℃ 变性 3 min, 94℃ 30 s 30 个循环, 55℃ 30 s, 72℃ 延伸 1.5 min
第二次 PCR, 50	0.5~0.8	4.2	0.5~0.6	94℃ 变性 2 min, 94℃ 30 s 5 循环, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 92℃ 30 s 20 循环, 55℃ 30 s, 72℃ 延伸 45 s

2.3.2 PCR 扩增产物的变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析

取解冻后的 nested PCR 产物样品 20~25 μL, 采用 DGGE (BioRad™) 系统对其进行分离,在 1×TAE 的缓存液 60℃ 180 V 下进行变性梯度为 35%~60% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 5h。电泳后的凝胶用荧光染色剂 (SyBR green) 黑暗染色 30min,超纯水冲洗凝胶后,立即用凝胶数字成像系统观测并拍照。

2.4 数据分析与统计

采用 AlphaEaseFC™ Software (FluorChem 4.2) 分析软件对成像后的电泳图片中不同泳道的共有电泳条带和总条带数量和密度进行条带匹配分析,依据下列公式计算土壤中氨氧化细菌的丰度 (N),均匀度 (E) 和多样性指数 (H) 以及相似性系数 (C_D),根据计算结果构建聚类树 (UPGMA)。

其中,多样性指数有 2 种表示方法。

Simpson's 指数:

$$H_{si} = 1 - \sum_{i=1}^N P_i^2$$

Shannon's 指数:

$$H_s = - \sum_{i=1}^N P_i \ln P_i$$

$$E = 1/H_{max} = 1/\ln N$$

$$C_D = 2j/(a + b)$$

式中,P_i 指某泳道第 i 条带的强度占该样品 (泳道) 中所有条带总强度的比例;N 指每个处理所有条带的总和。C_D 指 2 个 (A 和 B) 泳道间的相似性系数,a 和 b 指的是泳道 A 和泳道 B 分别具有的条带总数,j 指泳道 A 和泳道 B 共有的条带数。

所有实验数据用 Microsoft Excell 2000 和 SPSS

11.0 统计,置信水平为 95% ($p < 0.05$).

3 结果与分析

3.1 土壤碳、氮库、硝化势及 pH 值

尽管青藏高原原始森林 0~20 cm 的土壤总 C、N 库(有机质和全 N)显著高于天然草原土壤和农田生态系统.但在人工扰动的农田生态系统中,土壤 NO_3^- -N 含量显著高于森林和草原土壤(表 2).

土壤硝化势是指土壤中具有氨氧化能力的微生物将 NH_4^+ -N 转化为 NO_3^- -N 的最大能力^[5]. 青藏高原农田土壤的硝化势大约分别是森林和草原土壤的 9 倍和 11 倍,显著高于森林和草原土壤(表 2). 表 2 中硝化势和硝态氮含量的结果一致说明,青藏高原农田土壤的硝化作用显著高于森林和草原土壤^[16]. 换言之,将草地土壤转换为农田后,经过 40 余年的耕作,促进了土壤的硝化作用和硝化能力. 青藏高原原始森林土壤的 pH 值显著小于草原和农田土壤,草原与农田土壤的 pH 差异不显著(表 2).

表 2 青藏高原不同土地利用方式的土壤碳氮含量与硝化势¹⁾

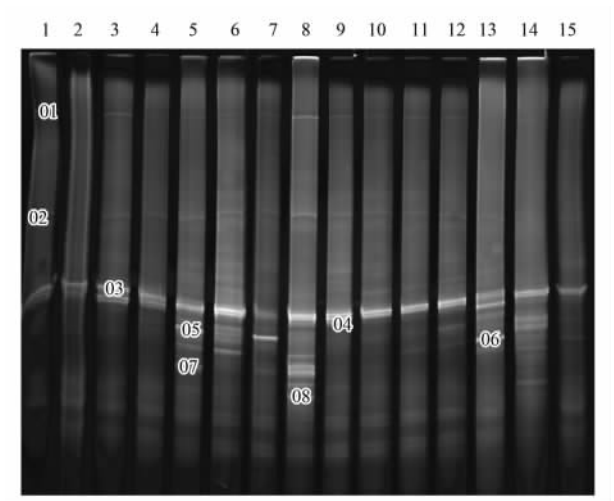
Table 2 Carbon and nitrogen pools and nitrification potential of soil soils from different LUT in Tibet plateau			
生态系统	原始森林	草原	农田
有机碳 SOC/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	83.3 ^a	34.2 ^b	53.9 ^{ab}
全氮 Total N/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	2.20 ^a	0.93 ^b	1.61 ^{a b}
硝态氮 NO_3^- -N/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	1.00 ^b	0.57 ^b	8.19 ^a
铵态氮 NH_4^+ -N/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	3.3	1.4	1.2
硝化势 Nitrification potential / $\text{mg} \cdot (\text{kg}^{-1} \cdot \text{d})^{-1}$	1.94 ^b	1.59 ^b	18.20 ^a
pH [H_2O]	5.28 ^b	6.02 ^a	6.13 ^a

1)表中数据为平均值,同一行标注相同字母为差异不显著,标不同字母为差异显著 ($p < 0.05$, $n = 5$)

3.2 氨氧化细菌(AOB)菌群的遗传多样性分析

DGGE 图谱中各泳道条带数目和亮度能够直观反映土壤中 AOB 群落的遗传多样性,丰富度、均匀度和多样性指数,是研究群落物种数及其遗传特征的综合指标.根据对青藏高原 3 个相邻的不同土地利用方式的土壤16S rDNA的 PCR- DGGE 图谱中各泳道条带位置、数目和亮度的分析(图 1),能够直接计算反映土壤中 AOB 群落的遗传多样性的丰富度、均匀度和多样性指数.结果表明,青藏高原原始森林土壤中 AOB 的菌群均匀度显著低于草原和农田土壤,草原和农田土壤中 AOB 的菌群均匀度没有显著差异.3 个生态系统 AOB 菌群的丰富度和多样性差异显著(表 3). 2 种多样性指数的评价方法均显示,西藏原始森林土壤中 AOB 的菌群多样性显著低于

草原和农田土壤;用 Shannon 指数评价法表明,天然草原土壤中 AOB 的菌群多样性高于农田,而用 Simpson 指数评价法为,天然草原土壤中 AOB 的菌群多样性与农田没有显著差异.



1~4:原始森林;5~9:草原;10~15:农田

图 1 青藏高原原始森林、草原和农田土壤氨氧化细菌的 DGGE 图谱¹⁾

Fig.1 DGGE analysis for AOB fragments retrieved from soil samples at Tibetan forest, grassland and crop field

表 3 青藏高原不同土地利用方式的土壤氨氧化细菌的遗传多样性分析¹⁾

Table 3 Analysis of genetic diversity for AOB of soils from different LUT in Tibetan plateau				
利用方式	均匀度	丰富度	Shannon's 指数	Simpson's 指数
原始森林	0.87b	10c	1.97c	0.81b
草原	0.95a	24.2a	3.05a	0.95a
农田	0.91ab	18.4b	2.67b	0.92a

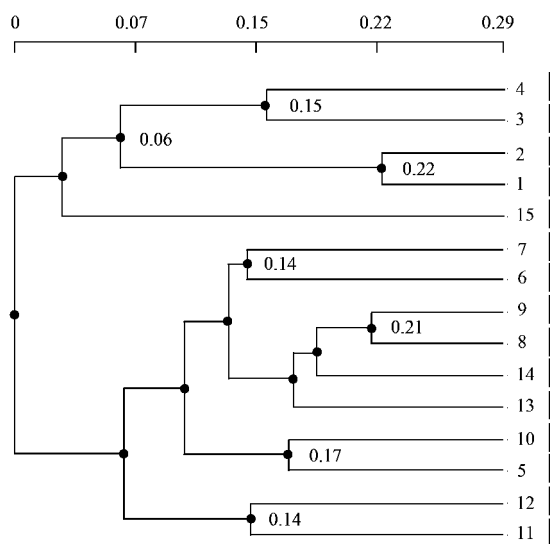
1)表中数据为平均值,同一列标注相同字母为差异不显著,标不同字母为差异显著 ($p < 0.05$, $n = 5$),

3.3 氨氧化细菌(AOB)的聚类分析

通过采用 FluorChem 4.2 分析软件对成像后的电泳图谱数字化定量分析,不同土样 AOB 的 DNA 一级序列数据构建聚类树 UPGMA(图 2). 结果显示,青藏高原 3 个生态系统中,天然草原与农田生态系统的 AOB 相似性系数最大,表明其亲缘关系最近.原始森林与天然草原的氨氧化细菌的相似性及亲缘关系次之,原始森林与农田土壤的 AOB 相似性最小,亲缘关系较远.原始森林生态系统的 AOB 可自成一类.

4 讨论

天然原始森林和草原由于没有收获以及人工干



1~4:原始森林; 5~9:草原; 10~15:农田

图2 西藏高原原始森林、草原和农田土壤氨氧化细菌的 DGGE 图谱聚类分析, 图右数字为实验样点编号

Fig. 2 Dendrogram structure of DGGE pattern for AOB fragments retrieved from soil samples at Tibetan native forests, natural grasslands and croplands, the numbers on right line of the dendrogram is for soil samples

扰相对较少, 环境中的碳、氮素可以通过植被生长和枯落季复一季地积累下来, 并在土壤中建立起有效的碳、氮储备库. 这对稳定生态环境的持续友好和生态系统功能的发挥具有极其重要的意义. 当自然生态系统被开垦为农田后并受到人类频繁的农业扰动 (如耕作、施肥、灌水), 土壤碳、氮库及氮素循环将会发生明显偏离^[16,18]. 西藏高原的天然草原开垦转换为农田 40 多年后, 土壤有机碳含量显著下降, 硝态氮浓度显著增加 (表 2). 说明自然生态系统被扰动破坏转换为农田会导致土壤氮素内循环由封闭式转化为开放式, 土壤向环境中排放碳、氮增加, 对土壤的环境风险增大. 并且, 土壤硝态氮浓度提高的直接原因是农田的硝化势显著提高.

早些的研究认为, 直接影响硝化作用的土壤氨氧化细菌在酸性森林土中其活性极低或完全失活^[19]. 即使为氨氧化细菌提供非常合适的培养条件, 其硝化活性也不能提高^[20]. 本研究运用分子生物学方法 PCR-DGGE 的分析结果表明, 在西藏高原 pH 最低的原始森林土壤中确实存在氨氧化细菌菌群, 但多样性、丰富度、均匀度均显著低于草原和农田 (表 3), 这是原始森林土壤硝态氮含量和硝化势均显著低于草地和农田的一个重要原因.

PCR-DGGE 图谱分析还证明, 西藏高原天然草

原生态系统的氨氧化细菌种类最多, 丰富度、多样性指数和均匀度也最高. 相邻的农田土壤的前身是草原, 其土壤中的氨氧化细菌的多样性和丰富度显著下降, 但仍与其前身草地土壤具有较高的相似性 (表 3). 通过聚类分析表明, 农田生态系统的 AOB 与草原的 AOB 亲缘关系较近, 与原始森林土壤 AOB 亲缘关系最远 (图 1). 本研究结果与早期报道一致, 自然生态系统被人类扰动会导致土壤环境中的微生物群落的生态多样性减少^[7], 土壤环境的生态功能相应减弱.

尽管农田生态系统 AOB 的生物多样显著低于相邻的草原生态系统, 但农田土壤的硝态氮含量和硝化势均显著高于草原 (表 2)^[16], 表面上看起来似乎矛盾的. 实际上很好理解, 土壤中并非所有的 AOB 都具有硝化活性, 这一点 Hermansson 等^[9]早有报道. 在本研究中, 采用的 nested PCR-DGGE 技术, 扩增时并不能识别 AOB 细胞是活性的还是休眠的, 因而扩增产物既有来自于活性 AOB 细胞, 也有来自于非活性的或者休眠的 AOB 细胞, 而直接影响土壤硝化作用的只能是具有活性的那部分 AOB 菌群. 草原土壤中检测到的 AOB 细菌尽管数目最多, 多样性最高, 但并不意味着 AOB 的生物活性最高. 相反, 尽管农田土壤中的 AOB 生物多样性低于草原, 但从土壤的硝化势和硝态氮含量可以推断起农田土壤中的 AOB 活性最高, 或优势 AOB 数量最大. 草原被开垦为农田后 40 多年来, 人类频繁的农业活动 (如耕作、施肥等管理措施) 会改变土壤结构和理化性质, 特别是被扰动后的土壤 pH 值显著提高, 原来微生物物种间的平衡被破坏^[22]. 对 AOB 来讲, 虽然 AOB 总体数量显著下降, 但某些优势 AOB 菌属在新的环境中生存下来, 活性得到提高^[14~16,18~21]. 由此产生的另一个问题, 为何在农田土壤中的氨氧化细菌的活性最高, 是生态系统转换后长期扰动的结果, 还是存在其它原因, 需要继续进一步研究.

西藏高原原始森林土壤中的 AOB 菌群数量最少, 生物多样性最低, 在酸性环境中, 这些少量的喜酸性氨氧化细菌可能长期休眠, 活性很低, 难以与土壤中的固 N 菌竞争, 致使土壤硝化作用极其微弱, 这是森林土壤硝化势最低的根本原因. 因此, 在这个意义上讲, 土壤氨氧化细菌区系与土壤的硝化作用的关系极为密切, 由此判断, 对土壤硝化过程起关键作用的并不是喜酸菌.

5 结论

土地利用方式改变/生态系统转换导致土壤碳、

氮库和硝化势发生显著改变, 西藏高原 3 个生态系统相比, 农田土壤的硝态氮浓度和硝化势均显著高于草原生态系统和森林生态系统. 原始森林土壤的氨氧化细菌的数量和活性均极低, 是其土壤硝化势显著低于草原和农田的直接原因. 将草原生态系统转换为农田后, 土壤氨氧化细菌菌群与草原仍存在较高的相似性, 但菌群多样性显著降低, 某些优势菌的活性得到提高使得农田土壤的硝化势和硝态氮含量显著提高.

致谢: 西藏农牧学院蔡晓布教授协助采样土样, 中国农业大学张福锁教授和陆雅海教授提供实验平台. 特此致谢!

参考文献:

- [1] Uri V, Lohmus K, Kund M, *et al.* The effect of land use type on net nitrogen mineralization on abandoned agricultural land: Silver birch stand versus grassland [J]. *Forest Ecology and Management*, 2008, **255** : 226-233.
- [2] Dilly O, Blume H P, Sehy U, *et al.* Variation of stabilized, microbial and biologically active carbon and nitrogen in soil under contrasting land use and agricultural management practices [J]. *Chemosphere*, 2003, **52** : 557-569.
- [3] Rhoades C C, Coleman D C. Nitrogen mineralization and nitrification following land conversion in montane Ecuador [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, **31** : 1347-1354.
- [4] Vitousek P M, John D A, Robert W H, *et al.* Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences [J]. *Ecology Application*, 1997, **7** : 737-750.
- [5] Vitousek P M, Gosz J R, Grier C C, *et al.* A comparative analysis of potential nitrification and nitrate mobility in forest ecosystems [J]. *Ecological Monographs*, 1982, **52** (2) : 155-177.
- [6] Neill C C, Pocolo M C, Steudler P A, *et al.* Nitrogen dynamics in soils of forests and active pasture in the western Brazilian Amazon basin [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1995, **27** : 1167-1175.
- [7] Prasad P, Basu S, Behera N. A comparative account of the microbiological characteristics of soils under natural forest, grassland and crop field from eastern India [J]. *Plant and Soil*, 1994, **175** : 85-91.
- [8] Alef K, Beck T H, Zelles L, *et al.* A Comparison of methods to estimate microbial biomass and N-mineralization in agricultural and grassland soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1988, **20** (4) : 561-565.
- [9] Hermansson A, Bäckman J S K, Svensson B H, *et al.* Quantification of ammonia-oxidising bacteria in limed and non-limed acidic coniferous forest soil using real-time PCR [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, **36** : 1935-1941.
- [10] Burger M, Jackson L E. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, **35** : 29-36.
- [11] Kowalchuk G A, Stienstra A W, Heilig G H J, *et al.* Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche (The Netherlands) [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, **31** : 207-215.
- [12] Kowalchuk G A, Bodelier P L E, Heilig G H J, *et al.* Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridization [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **27** : 339-350.
- [13] Muyzer E C D, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59** (3) : 695-700.
- [14] Torsvik V, Daae F L, Sandaa R A, *et al.* Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments [J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, **64** : 53-62.
- [15] Bruggemann J, John R S, Chang Y J, *et al.* Competitive PCR - DGGE analysis of bacterial mixtures an internal standard and an appraisal of template enumeration accuracy [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, **40** : 111-123.
- [16] Yang L L, Zhang F S, Mao R Z, *et al.* Conversion of natural ecosystems to cropland increases the soil net nitrogen mineralization and nitrification in Tibet [J]. *Pedosphere*, 2008, **18** (6) : 699-706.
- [17] Hart S C, Stark J M, Davidson E A, *et al.* Nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification [A]. In: Weaver R W, Angle S, Bottomley P, (eds). *Methods of soil analysis, Part 2, Microbiological and biochemical properties* [M]. *Soil Science Society of America, Madison W*, 1994. 985-1018.
- [18] Bruns M A V, Stephen J R, Kowalchuk G A. Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA Gene sequences in native, Tilled, and Successional soils [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65** (7) : 1994-2000.
- [19] Degrange V, Couteaux M, Anderson J M, *et al.* Nitrification and occurrence of nitro bacteria by MPN-PCR in low and high nitrifying coniferous forest soils [J]. *Plant and Soil*, 1998, **198** : 201-208.
- [20] Bäckman J S K, Hermansson A, Tebbe C C, *et al.* Liming induces growth of a diverse flora of ammonia-oxidising bacteria in acid spruce forest soil as determined by SSCP and DGGE [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, **35** : 1337-1347.
- [21] Grfin T S. Nitrogen availability [A]. In: Schepers J S, Raun W B, Ollett R F. (eds). *Nitrogen in agricultural systems . Agronomy Monograph 49* [M]. *American Society of Agronomy, Madison W*, 2008. 613-646.
- [22] 陈哲, 陈春兰, 秦红灵, 等. 化肥对稻田土壤细菌多样性及硝化、反硝化功能菌组成的影响 [J]. *生态学报*, 2009, **29** (11) : 6142-6147.