

水稻土细菌硝化作用基因(*amoA*和*hao*)多样性组成与长期稻草还田的关系研究

陈春兰^{1,2,3}, 陈哲^{1,2,3}, 朱亦君^{1,2}, 吴敏娜^{1,2}, 秦红灵^{1,2}, 魏文学^{1,2*}

(1. 中国科学院亚热带农业生态研究所 亚热带农业生态过程重点实验室, 长沙 410125; 2. 中国科学院桃源农业生态试验站, 湖南 415700; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:以中国科学院桃源农业生态试验站长期定位试验的土壤样品为对象,采用PCR扩增、克隆文库构建以及序列测定等分子生物学技术分析稻草还田对亚硝化功能基因*amoA*和*hao*多样性的影响.结果表明,水稻土稻草还田处理(氮磷钾+水稻秸秆,SR)降低了*amoA*和*hao*基因的多样性,其Shannon指数分别为3.7和3.2;而氮磷钾处理(CK)的Shannon指数达到4.0和3.7. LIBSHUFF分析比较CK和SR处理克隆文库的差异,结果显示*amoA*和*hao*基因处理间群落结构*p*值分别为0.002和0.001,均达到极显著水平.序列分析结果表明,对于*amoA*基因,只检测到与亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)相似的以及未知的*amoA*基因相似的基因,并且与*Nitrosospira*相似的只出现在SR处理中,相似率达96%以上,而与未知的*amoA*基因相距最近的已知菌属也是*Nitrosospira*;获得的*hao*基因则分布于变形菌门(Proteobacteria)中的3个纲(α 、 β 、 γ),其中CK处理获得的*hao*基因主要与*Silicibacter*、甲基球菌属(*Methylococcus*)相似,SR处理获得的基因主要与亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)、亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)亲缘关系较近.系统发育树分析显示亚硝化基因(*amoA*、*hao*)在这2个处理中可被分为4个基因簇(Cluster),稻草还田使亚硝化细菌群落发生了明显的分异,出现了基因聚类现象,并且在*amoA*基因树图中出现了只由SR处理构成的分支(Cluster IV).总体来说,长期稻草还田降低了亚硝化基因*amoA*和*hao*的多样性,明显改变了亚硝化细菌群落结构.

关键词:水稻秸秆还田;*amoA*;*hao*;多样性;群落结构

中图分类号:X171.3 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2010)06-1624-09

Effects of Rice Straw on the Diversity of Nitrifying Genes (*amoA* and *hao*) in Paddy Soil

CHEN Chun-lan^{1,2,3}, CHEN Zhe^{1,2,3}, ZHU Yi-jun^{1,2}, WU Min-na^{1,2}, QIN Hong-ling^{1,2}, WEI Wen-xue^{1,2}

(1. Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China; 2. Taoyuan Station of Agro-ecology Research, Chinese Academy of Sciences, Hunan 415700, China; 3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The effects of long-term (16 years) fertilization on the diversity and community structure of soil ammonia-oxidizing gene (*amoA*) and hydroxylamine-oxidizing gene (*hao*) in paddy soil were evaluated using the methods of polymerase chain reaction, cloning and sequencing. The soil samples were collected from the treatments of NPK (CK) and NPK plus rice straw (SR) of the long-term field fertilization experiment in Taoyuan Agro-ecological Experimental Station. The Shannon Indices showed that the diversity of *amoA* and *hao* in SR treatment was lower than that in CK, and LIBSHUFF statistical analyses demonstrated that the sequence compositions of both *amoA* and *hao* libraries were significantly different between CK and SR. The phylogenetic trees indicated that some clusters appeared in SR treatment but were not detected in CK treatment. As to *amoA*, only *Nitrosospira* besides the uncultured *amoA* sequences were cloned from the two treatments, while no *Nitrosomonas* species were detected. As to *hao*, the strains from *Silicibacter* and *Methylococcus* were dominant in CK, while in SR the strains from *Nitrosospira* and *Nitrosomonas* were dominant. Sum up, the long-term rice straw application has caused a remarkable impact on the diversity and community structure on Nitrosobacteria.

Key words: rice straw returning; *amoA*; *hao*; diversity; community structure

稻草秸秆中含有丰富的氮、磷、钾、硅及其它微量元素,一直以来都被列为重要的有机质肥料之一.稻草还田后在微生物的作用下腐解,为土壤提供丰富的有机质以及速效养分,从而改善土壤物理化学及生物学性质,有助于提高作物产量.同时稻草还田可为微生物的繁衍提供有利条件,激发土壤微生物

的大量繁殖^[1-3]. 陈安磊等^[4]的研究结果显示稻草

收稿日期:2009-08-06;修订日期:2009-10-19

基金项目:中国科学院百人计划项目(KZCX2-YW-BR-01);国家自然科学基金项目(40771115);国家科技支撑计划项目(2008BADA7B07)

作者简介:陈春兰(1981~),女,硕士研究生,主要研究方向为土壤分子生态,E-mail:ccl-06.10@163.com

* 通讯联系人,E-mail:wenzxue@isa.ac.cn

还田能显著提高微生物量,周文新等^[5]利用 BIOLOG 检测法探讨了微生物群落多样性,表明稻草还田提高了土壤细菌数量,改善了土壤微生物的功能多样性. Nakamura 等^[6]用磷脂脂肪酸法(PLFA)发现将经不同处理的稻草还田后,引起微生物群落发生不同的变化.

自养硝化细菌控制农业土壤中的硝化作用^[7],而亚硝化过程是硝化过程的限速步骤^[8]. 亚硝化作用(Nitrosation)一般是指微生物将 NH_3 氧化为 NH_2OH ,继而氧化为 NO_2^- 的过程. 在亚硝化过程中主要是由氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, AMO)和羟胺氧化还原酶(hydroxylamine oxidoreductase, HAO)催化反应的进行,而 AMO 由 *amoA*、*amoB*、*amoC* 基因编码的 3 个亚基组成,其中 *amoA* 因具有一定的序列保守性而作为代表成为被研究最多的基因^[9,10]. 肖嫩群等^[2]通过比色法测定水稻土中硝化作用的强度,结果表明稻草还田引起硝化作用增强. 而韩琳等^[11]用最大可能法(MPN)发现,秸秆还田反而使硝化细菌数量较对照有所减少.

现代分子生物学技术通过对核苷酸序列的分析,从遗传本质的层面上对微生物群落进行较客观的分析,可以较精确地揭示微生物种类和遗传多样性^[12]. 近几年,分子技术广泛用于土壤微生物群落多样性以及功能微生物多样性的研究中^[13-15]. 目前对于稻草还田引起的微生物群落及功能多样性的研究较少,且多以微生物计数的方法来研究土壤微生物群落的区系构成^[16].

本研究以中国科学院亚热带农业生态研究所桃源农业生态试验站的水稻长期施肥定位试验为基础,通过分子生物学技术分析了稻草还田对土壤亚硝化基因 *amoA* 和 *hao* 多样性的影响,以期从功能基因方面探讨稻草还田与水稻土中硝化作用的关系做铺垫.

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

土壤样品采自桃源农业生态试验站水稻长期施肥定位试验田(28°55′49.8″N, 111°26′25.7″E),其海拔高度为 89 m. 土壤为青隔黄泥,母质为第四纪红土,种植制度为双季稻. 试验始于 1990 年,共设置了 10 个施肥处理,重复 3 次. 本试验研究选择其中的 2 个处理,即氮磷钾肥(CK)和氮磷钾肥配合稻草还田(SR). 具体施肥情况:供试化肥为尿素、过磷酸钙和氯化钾. 1990~1996 年:N 为 262.5 kg/hm²;P 为 39.3 kg/hm²;K 为 137.0 kg/hm². 1997 年至今:N 为 182.3 kg/hm²;P 为 39.3 kg/hm²;K 为 197.2 kg/hm². 稻草还田处理除施用 N、P、K 外,小区冬季种植的紫云英作早稻基肥,早晚稻秸秆全部直接还田.

土壤样品采集时间为 2007 年 3 月 22 日,此时稻田土壤处于落干状态,各小区按 5 点法取表层 0~15 cm 土壤混匀,一部分土样(约 200 g)用液氮冷冻后 -80℃ 保存,供分子生物学研究,另一部分土样用做常规分析. 土壤样品的理化性状见表 1.

表 1 2 种施肥处理土壤的理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the soil samples from the two fertilization treatments					
处理	有机碳/g·kg ⁻¹	速效磷/mg·kg ⁻¹	速效钾/mg·kg ⁻¹	速效氮/mg·kg ⁻¹	pH
CK	19.45±3.78b	15.00±0.01b	43.01±2.65b	132.42±7.36b	5.10±0.15a
SR	27.35±0.58a	22.15±1.40a	152.90±5.77a	182.09±3.29a	5.05±0.38a

1.2 DNA 的提取

参照文献^[17]中的 SDS-GITC-PEG 方法并做适当修改. 以下主要列举所作修改处:称取 0.5 g 土样放入 2 mL 离心管中,步骤中 SDS 裂解液,异硫氰酸胍溶液,2×CTAB 溶液的加入量分别改为 800、200 和 900 μL,加入氯仿-异戊醇后离心速度改为 13 200 r/min,10 min. 其它操作步骤不变. 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 片段大小,并用 NanoDrop 核酸蛋白测定仪(ND-1000)测定 DNA 的浓度及质量. 每个处理的 3 个重复分别提取 DNA,然后取等量 DNA 混合为一个样品.

1.3 简并引物的设计

从 NCBI 数据库(National Center for Biotechnology Information database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中选择一些来自环境样品中的不同种类微生物的 *amoA*、*hao* 基因氨基酸及其对应的核苷酸序列. 其中 *amoA* 基因选择了 *Nitrosospira* 和 *Nitrosomonas* 这 2 个属以及一些未知的功能基因共 9 个(Accession numbers: CAD62100、CAA62334、CAC84851、NC_004757、NC_008344、NC_007614、AAB38709、AAB38710、AAO60368), *hao* 基因则选择了 *Silicibacter*、*Nitrosospira*、*Nitrosomonas* 和 *Methylococcus*

这 4 个属的已知菌中的功能基因共 6 个 (Accession numbers: NC_006569、NC_007614、NC_008344、NC_004757、AB030387、NC_002977), 通过 ClustalW 在线软件 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) 进行比对,

找 2 段位置合适且长度适宜的保守氨基酸区域, 结合对应的核苷酸序列分别设计上游和下游引物. 引物序列信息见表 2, *amoA* 和 *hao* 基因的目的片段长度分别为 576 bp 和 805 bp.

表 2 用于扩增 *amoA* 和 *hao* 基因的简并引物

Table 2 Primer sequences and positions used to amplify *amoA* and *hao* fragments

引物 ¹⁾	位点 ²⁾	引物序列 ³⁾ (5'-3')	简并性
<i>amoA</i> -F	150 ~ 170	CTGGGAYTTCTGGMTKGACTG	8
<i>amoA</i> -R	701 ~ 725	AGTARASYTTKCCRARRTACCACCA	128
<i>hao</i> -F	499 ~ 519	GTMGGHTGYATYGACTGYCAC	48
<i>hao</i> -R	1 285 ~ 1 303	GRCGRTTGGTBKTYTGDC	144

1) 上下游引物的名称分别在最后加上字母 F 和 R; 2) *amoA* 和 *hao* 引物的位置分别用以下 2 种菌种表示: *Nitrosospira briensis* (AAB38709) 和 *Nitrosomonas* sp. ENI-11 (AB030387); 3) Y = C 或 T; S = C 或 G; R = A 或 G; B = C、G 或 T; M = A 或 C、K = G 或 T; H = A、C 或 T; D = A、G 或 T

1.4 目的片段的 PCR 扩增

分别采用以上简并引物 (表 2) 扩增 *amoA* 和 *hao* 基因. 反应体系为 10 × buffer 2.5 μL; 10 mmol · L⁻¹ dNTP 1 μL, 10 μmol · L⁻¹ 的上下游引物各 1 μL; *Taq* DNA 聚合酶 1 U; 模板 30 ng; 加灭菌双蒸馏水至 25 μL. 扩增 *amoA* 的反应条件为: 95℃ 预变性 5 min; 45 个循环为 95℃ 30 s, 48℃ 45 s, 72℃ 1 min; 72℃ 终延伸 10 min. 扩增 *hao* 的反应条件为 95℃ 5 min; 40 个循环为 95℃ 30 s, 53℃ 45 s, 72℃ 1 min; 72℃ 终延伸 10 min.

1.5 目的基因的克隆与测序

利用试剂盒 (Wizard SV gel and PCR clean-up system, Promega) 纯化 PCR 产物, 并通过 pGEM-T (Promega) 载体试剂盒对回收产物构建克隆文库, 挑取克隆子, 用 M13F 和 M13R 引物 PCR 筛选含有目的片段的阳性克隆, 然后送往上海生工生物工程有限公司测序.

1.6 系统发育树构建与多样性分析

目的基因序列通过 ClustalW 软件分析, 将相似比 > 98% 的归为同一个操作单元 (OTU)^[15] 及一般意义上的同一个基因型. 通过 Clustal X 软件对各 OTU_s 进行碱基序列的多重比对, 并利用 Mega (4.0) 中的邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树.

采用 Shannon 多样性指数分析 *amoA* 和 *hao* 基因种群的多样性, 计算公式为:

$$H = - \sum P_i \ln P_i$$

Pielou 均匀度指数分析各个基因型的相对密度:

$$E = H/H_{\max} \quad (\text{其中 } H_{\max} = \ln S)$$

同时通过丰富度曲线对优势种进行比对分析^[18].

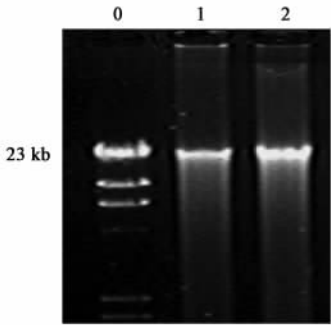
以 95% 为置信度, 利用 LUBSHUFF 软件对 2 个

文库间基因序列的差异显著性进行分析^[19].

2 结果与分析

2.1 总 DNA 的提取

从 CK 和 SR 处理土壤中提取的总 DNA 比较完整, 片段大小约为 23 kb (图 1). 产量分别为每 g 干土 (25.2 ± 6.7) μg 和 (53.3 ± 7.0) μg, 其纯度 *A*_{260/280} 值分别为 1.89 ± 0.02 和 1.96 ± 0.01.



0. Maker (λDNA/Hind III) 1. CK 处理 2. SR 处理

图 1 DNA 凝胶电泳图

Fig. 1 Screen of DNA extraction from CK and SR treatments

2.2 多样性指数分析

对上述 4 个文库的 OTUs、Shannon 指数、均匀度指数分析结果见表 3. 功能基因 *amoA* 和 *hao* 在 SR 处理中的 Shannon 指数分别比 CK 处理低 0.3、0.5; 均匀度指数也低于 CK 处理, 其中 *hao* 基因的均匀度降低了 11%. 稻草还田降低了亚硝化基因群落组成的多样性以及均匀度.

2.3 硝化细菌的丰富度曲线及优势种

丰富度曲线 (图 2) 显示从水稻土 SR 处理中所获得的 *hao* 基因均匀度较低. 所有处理中都存在优

表 3 硝化基因 <i>amoA</i> 和 <i>hao</i> 的多样性指数				
Table 3 Diversity indices of <i>amoA</i> and <i>hao</i> genes				
基因处理	<i>amoA</i>		<i>hao</i>	
	CK	SR	CK	SR
目的基因数	70	70	70	70
可操作分类单元数目	61	48	46	37
Shannon 指数	4.0	3.7	3.7	3.2
均匀度指数	0.97	0.96	0.96	0.85

势种(克隆子数占总克隆子数的 5.0% 以上的 OTU_s,表 4),其中在 SR 处理中,序列号为 FJ493744 的 *hao* 基因占该文库总克隆数的比例高达 22.9%

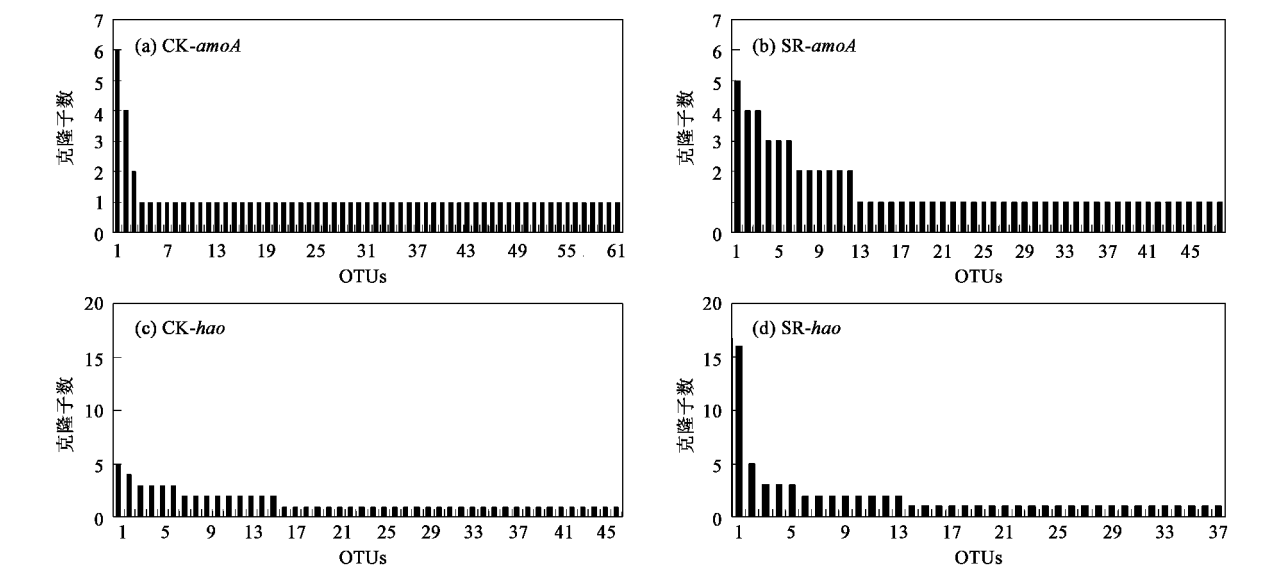


图 2 *amoA* 和 *hao* 基因在 CK 及 SR 处理中的丰富度曲线
Fig.2 Rank-abundance curves of *amoA* and *hao* population in CK and SR treatments

表 4 两处理中亚硝化细菌的优势种列表								
Table 4 Dominate species of nitrite bacteria in the two treatments								
项目	amoA				hao			
	FJ210291	FJ210293		FJ210436	FJ493721	FJ493719	FJ493744	FJ493752
处理	CK	CK	SR	SR	CK	CK	SR	SR
克隆数	6	4	4	4	4	5	16	5
百分比/%	8.6	5.7	5.7	5.7	5.7	7.1	22.9	7.1

2.4 处理间显著性分析

运用 LIBSHUFF 软件分析文库间的序列差异显著性,结果显示 *amoA* 和 *hao* 两基因在 2 个处理文库间均成极显著性差异($p < 0.01$).这说明稻草还田处理对同一功能微生物的遗传多样性产生了显著的影响,明显改变硝化细菌种群组成特性.

2.5 系统发育树分析

根据与 GenBank 中的序列比对结果,从水稻土中克隆的 *amoA* 基因主要与不可培养的硝化细菌相似,相似率达 86% ~ 99%(除 2 个克隆的相似率分

[对应图 3(d),第一个 OTU_s].表 4 还显示 *amoA* 基因在 2 个处理中出现了重叠 OTU_s(2 个处理中都出现的 OTU_s),并且都属于优势种(序列号为 FJ210293,占文库比例均为 5.7%),说明稻草还田对某些氨氧化菌的优势种的丰度无明显影响.在各文库中还存在一些次要优势种(克隆子数占总克隆子数的 3.0% ~ 4.5% 的 OTU_s,如 FJ210450 含有 3 个克隆子)和重叠 OTU_s(如 FJ210338),但组成各群落的 OTU_s 主要是非优势种.总体来说,长期稻草还田使硝化细菌的优势菌群发生了改变.

别为 72% 和 83% 外,序列号分别为 FJ210441 和 FJ210424),这些菌可能与亚硝化螺菌有相对较近亲缘关系(因为比对中与其相隔最近);只有从 SR 处理中克隆的部分 *amoA* 基因与亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)相似,相似率达 96% 以上.

根据树图的结构,将 *amoA* 基因系统发育树状图分成 4 个 Clusters(图 3).Cluster I、II、III 3 个类群(占总克隆数的 80%)与未培养的 *amoA* 基因的亲缘关系较近,说明水稻土中氨氧化细菌种类大部分还未被分离鉴定,目前对其作用机制了解也很少.只



各分支根部的数字表示1 000次重抽样分析后支持率 > 50% 的值, 括号前的字母数字为提交序列号, 括号中的字母表示施肥处理, 其中 CK 表示对照 (化学肥料), SR 表示稻草还田配施化学肥料处理, 以 *Nitrosococcus* 为外源序列

图3 水稻土中 *amoA* 基因的系统发育树图

Fig. 3 Phylogenetic tree of *amoA* from two fertilization treatments in a paddy soil

有 Cluster IV 的 OTU_s 与已知的亚硝化螺菌属细菌亲缘关系较近,其中与 *Nitrosospira* sp. (EF175097) 的相似性达到 96%、97%,且该簇的所有序列均来自 SR 处理,说明稻草还田后有利于此类硝化螺菌的富集。另外在这 4 个簇中 Cluster I 的 OTU_s 数最多,可能为优势类群。

与 *amoA* 基因序列不同的是从水稻土中克隆的 *hao* 基因序列组成多与已分离培养的细菌相似,其中主要与变形菌门(Proteobacteria)中的 *Silicibacter*, 亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*),亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*),甲基球菌属(*Methylococcus*)相似,相似率分别在 72%~75%、88%~90%、76%~86%、76%~89% 之间。

hao 基因的发育树图(图 4)表明,其序列主要分布在 4 个 Clusters 中,分别属于变形菌门(Proteobacteria)的 3 个纲(α 、 β 、 γ)^[20],其中 Cluster II 和 Cluster III 分别与 β -变形菌纲的 *Nitrosomonas* 和 *Nitrosospira* 这 2 个属相似,这些序列除一个来自 CK 处理外,其它均来自稻草还田处理(SR),稻草还田可能激发了 *Nitrosomonas* 和 *Nitrosospira* 属细菌的繁殖。Cluster I 和 Cluster IV 的序列组成中同时包含有 CK 和 SR 这 2 个处理,分别与 *Silicibacter* 和 *Methylococcus* 属的 *hao* 基因有一定的相似度,但主要来自于 CK 处理(分别占 91.9% 和 91.7%)。稻草还田导致了土壤中含 *hao* 基因细菌群落组成发生改变,一些种属得到了富集。

另外,不同施肥处理导致了硝化作用基因 *amoA* 和 *hao* 种群的聚类现象(见图 3 和图 4 中阴影部分),图中阴影(B)表示 CK 处理导致的聚类,阴影(G)表示 SR 处理的基因聚类。*amoA* 树图中 CK 处理的聚类现象主要发生在 Cluster I、Cluster II,SR 处理则主要发生在 Cluster II、Cluster IV。与 *amoA* 基因相比,*hao* 基因的聚类现象更加明显,每个 Cluster 中都存在一个聚集块。

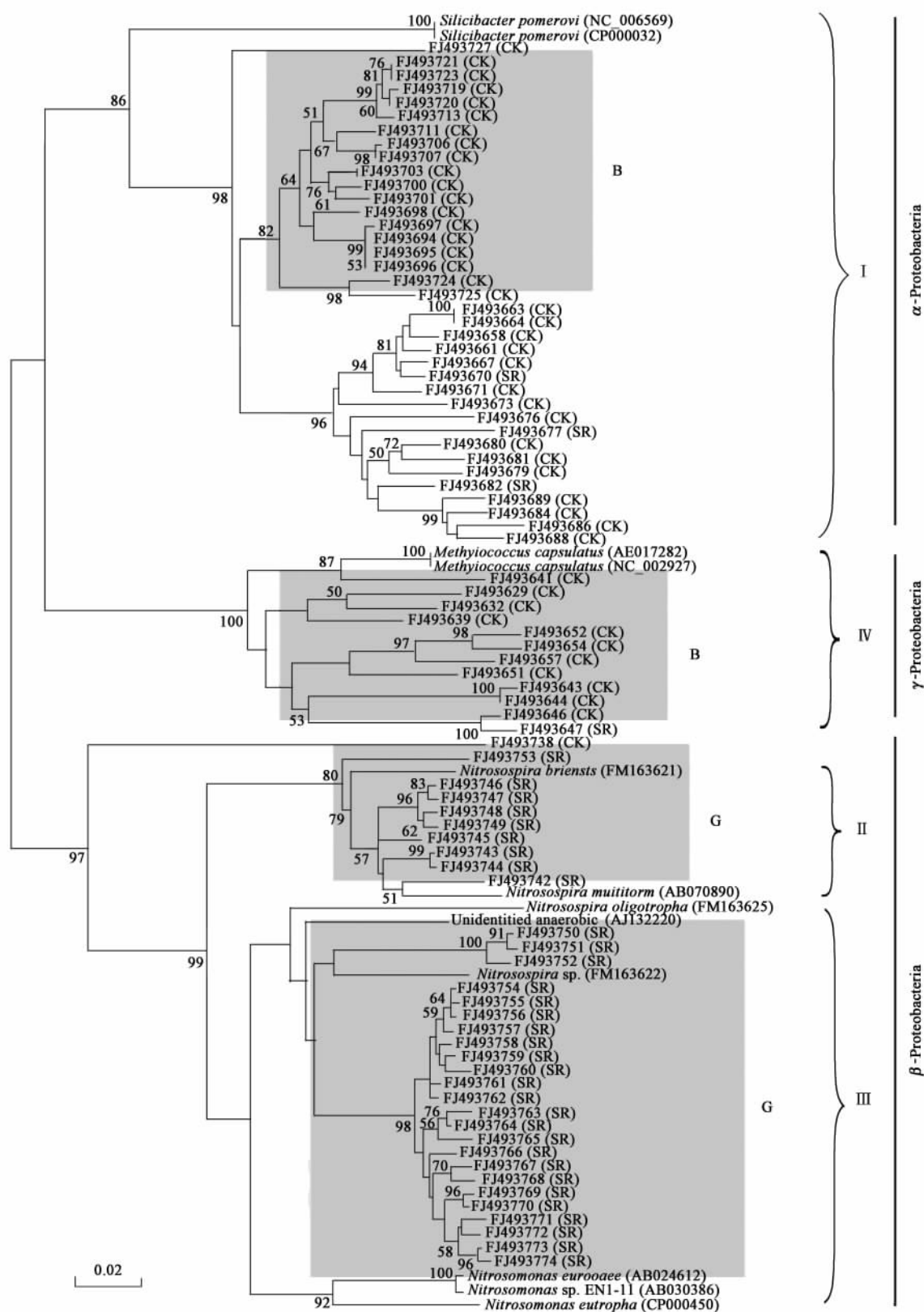
3 讨论

陈安磊等^[4]通过氯仿熏蒸-K₂SO₄ 等方法测得长期稻草还田处理增加了土壤微生物生物量,本研究从长期稻草还田处理土壤中所提总 DNA 量是 CK 处理的近 2 倍,反映了微生物生物量较大。稻草还田增加了土壤的有机质和有效养分含量,改善了土壤结构^[21],给微生物的繁衍提供良好的条件;同时由于稻草还田明显增加了土壤的有机物含量,可溶性有机成分含量增加,为部分微生物种群提供了充足

的碳源和养料而大量繁殖。但是,稻草还田处理的 *amoA* 和 *hao* 基因多样性指数及均匀度均低于 CK 处理,其结果可能是优势种群突出而非优势种群的发展受到竞争性抑制,从而出现了多样性指数下降和均匀度减少的现象^[22]。Muyzer^[23]的研究也表明一些优势种群的存在导致细菌群落的简单化,从而使只有占优势的种群才能被观测到。本研究反映了稻草还田增加了总微生物量,但对某类功能微生物的多样性不一定有促进作用。文献[9]中也报道了微生物总量与功能微生物量的关系不一致的现象,说明氨氧化细菌功能微生物比总微生物更能反映土壤中 N 素循环情况。也有文献报道^[24,25],由于有机物的加入引起土壤中生物可利用碳含量的增加,从而增加了异养细菌的生长,造成对氨的竞争利用,进而导致氨氧化细菌多样性的减少。

稻草还田不仅影响了微生物生物总量^[2,3],同时也改变了硝化作用功能基因群落组成及分布,导致 *amoA* 和 *hao* 基因组成中的 *Nitrosospira* 种群和 *hao* 基因的 *Nitrosospira*、*Nitrosomonas* 种群的差异繁殖,究其原因,可能是上述 2 个种群因稻草能为其提供良好的生存环境而大量繁衍。尽管笔者克隆的 *amoA* 基因组成大部分为未被培养的类群,但与 *Nitrosospira* 的 *amoA* 基因有部分相似性,也就是说这些菌有可能是未知的 *Nitrosospira*。张斌等^[26]从不同废水膜生物反应器处理(MBR)系统所克隆到氨氧化细菌中,绝大多数也为未经培养的菌株。有报道表明^[27,28]土壤中的氨氧化功能基因 *amoA* 主要存在于 β -Proteobacteria 中。Innerebner 等^[29]从化肥和 4 种不同的有机肥处理的样地中克隆出了 β -Proteobacteria 的 2 个属 *Nitrosospira* 和 *Nitrosomonas*;Fierer 等^[30]对 23 种不同生态系统土壤的研究结果显示 80% 氨氧化细菌属于 *Nitrosospira*;He 等^[15]在对不同施肥制度氨氧化细菌的多样性及丰度的研究中也只发现了与 *Nitrosospira* 相似的菌群。本研究结果进一步验证了 *amoA* 基因主要存在于 *Nitrosospira* 属中。单施化肥同样导致 *hao* 基因种群 *Silicibacteri* 和 *Methylococcus* 的聚类效应,而引起这种对 *hao* 基因明显分离的具体原因还不太清楚。而本研究中长期施肥处理对硝化基因群落结构和组成也都有着明显的影响。

Avrahami 等^[31]研究发现较长时间(多于 16 周)不同的施肥处理以及土壤温度改变了氨氧化细菌群落结构,Bäckman 等^[32]在酸性森林土壤中散洒石灰后引起土壤 pH 变化从而导致氨氧化细菌群落结构



各分支根部的数字表示1 000次重抽样分析后支持率 > 50% 的值, 括号中的字母表示施肥处理,

其中 CK 表示对照 (化学肥料), SR 表示稻草还田配施化学肥料处理

图 4 水稻土中 *hao* 基因的系统发育树图

Fig. 4 Phylogenetic tree of *hao* from two fertilization treatments in a paddy soil

的改变,He^[15]以及Olsson^[10]等研究也发现在酸性土壤中pH对氨氧化细菌群落结构产生较大影响.本研究中2种施肥处理没有引起土壤pH差异,长期(16 a)施肥可能是导致氨氧化细菌群落结构变化的原因之一.另外LUBSHUF结果表明稻草还田文库中的*amoA*基因序列组成与对照文库存在极显著差异,其原因之一可能与AMO的底物有关,McCarty^[33]研究显示,除NH₃之外,尚有40多种化合物可作为AMO的底物(包括<C₈的各种直链烷烃、<C₅的烯烃、环己烷及多种芳香烃).稻草还田显著地增加了土壤中的有机碳(表1),在微生物分解过程中产生了许多可供AMO氧化的碳水化合物,从而促进可利用该类底物的*amoA*基因繁衍.

4 结论

通过采用分子生物技术研究稻草还田对水稻土中亚硝化基因*amoA*和*hao*多样性及群落分布特点的影响发现,稻草还田降低*amoA*与*hao*基因群落的多样性,显著改变了含这2个基因的细菌群落结构组成,并导致了某些氨氧化菌群的富集.

参考文献:

- [1] 蒋廷杰, 谭洁, 祖智波. 稻草还田对晚稻土有机氮素转化生物指标的影响[J]. 耕作与栽培, 2006, (6): 8-10.
- [2] 肖嫩群, 张杨珠, 谭周进, 等. 稻草还田翻耕对水稻土微生物及酶的影响研究[J]. 世界科技研究与发展, 2008, 30(2): 192-194.
- [3] Liu M Q, Hu F, Chen X Y, *et al.* Organic amendments with reduced chemical fertilizer promote soil microbial development and nutrient availability in a subtropical paddy field: The influence of quantity, type and application time of organic amendments[J]. Appl Soil Ecol, 2009, 42: 166-175.
- [4] 陈安磊, 王凯荣, 谢小立. 施肥制度与养分循环对稻田土壤微生物生物量碳氮磷的影响[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(6): 1094-1099.
- [5] 周文新, 陈冬林, 卜毓坚, 等. 稻草还田对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 环境科学学报, 2008, 28(2): 326-33.
- [6] Nakamura A, Tun C C, Asakawa S, *et al.* Microbial community responsible for the decomposition of rice straw in a paddy field: estimation by phospholipid fatty acid analysis[J]. Biol Fertil Soils, 2003, 38(5): 288-295.
- [7] Killham K. Nitrification in coniferous forest soils[J]. Plant Soil, 1990, 128(1): 31-44.
- [8] Jetten M S M, Wagner M, Fuerst J, *et al.* Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process[J]. Environ Biotechnol, 2001, 12(3): 283-288.
- [9] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology[J]. Annu Rev Microbiol, 2001, 55(1): 485-529.
- [10] Olsson P A, Hansson M C, Burleigh S H. Effect of P availability on temporal dynamics of carbon allocation and glomus intraradices high-affinity P transporter gene induction in Arbuscular mycorrhiza[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(6): 4115-4120.
- [11] 韩琳, 王爰屹, 史奕, 等. FACE环境下不同秸秆与氮肥管理对稻田土壤硝化和反硝化细菌的影响[J]. 土壤, 2006, 38(6): 762-767.
- [12] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. Science, 1997, 276(5313): 734-740.
- [13] Gelsomino A, Keijzer-Wolters A C, Cacco G, *et al.* Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis [J]. J Microbiol Methods, 1999, 38(1-2): 1-15.
- [14] Zhong W H, Cai Z C, Yin L C, *et al.* Effects of the long-term application of inorganic fertilizers on microbial community diversity in rice-planting red soil as studied by using PCR-DGGE [J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(10): 4011-4018.
- [15] 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]. Environ Microbiol, 2007, 9(9): 2364-2374.
- [16] 谭周进, 李倩, 李建国, 等. 稻草还田量对晚稻土壤微生物数量及活度的动态影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(3): 670-673.
- [17] 杨建, 洪葵. 红树林土壤总DNA不同提取方法比较研究[J]. 生物技术通报, 2006(增刊): 366-371.
- [18] Hughes J B, Bohannon B J M. Application of ecological diversity statistics in microbial ecology[M]. Molecular Microbial Ecology Manual, 2004, 2: 1321-1344.
- [19] Singleton D R, Furlong M A, Rathbun S L, *et al.* Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(9): 4374-4376.
- [20] Head I M, Hiorns D, Embley T M, *et al.* The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. J Gen Microbiol, 1993, 139(6): 1147-1153.
- [21] 黄昌勇. 土壤学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. 44-45.
- [22] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, *et al.* Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam[J]. Environ Microbiol, 2008, 10(6): 1601-1611.
- [23] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems[J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2(3): 317-322.
- [24] Fauci M F, Dick R P. Soil microbial dynamics: short-and long-term effects of inorganic and organic nitrogen[J]. Soil Sci Soc Am J, 1994, 58(3): 801-806.
- [25] Shi W, Norton J M. Microbial control of nitrate concentrations in an agricultural soil treated with dairy waste compost or ammonium

- fertilizer[J]. Soil Biol Biochem, 2000, **32**(10): 1453-1457.
- [26] 张斌,孙宝盛,刘慧娜,等. 处理不同废水 MBR 系统中微生物群落结构的比较[J]. 环境科学,2008,**29**(10):2944-2949.
- [27] Stephen J R, McCaig A E, Smith Z, *et al.* Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, **62**(11): 4147-4154.
- [28] Woese C R, Weisburg W G, Paster B J, *et al.* The phylogeny of the purple bacteria: the beta subdivision [J]. Syst Appl Microbiol, 1984, **5**(3): 327-336.
- [29] Innerebner G, Knapp B, Vasara T, *et al.* Traceability of ammonia-oxidizing bacteria in compost-treated soils[J]. Soil Biol Biochem, 2006, **38**(5): 1092-1100.
- [30] Fierer N, Carney K M, Horner-Devine M C, *et al.* The Biogeography of Ammonia-Oxidizing Bacterial Communities in Soil[J]. Microbial Ecol, 2009, **58**(2): 435-445.
- [31] Avrahami S, Conrad R. Patterns of community change among ammonia oxidizers in meadow soils upon long-term incubation at different temperatures [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, **69**(10): 6152-6164.
- [32] 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 Biol Biochem, 2003,**35**(10): 1337-1347.
- [33] McCarty M G. Modes of action of nitrification inhibitors[J]. Biol Fertil Soils, 1999, **29**(1): 1-9.