

长期施用氮肥对土壤细菌硝化基因多样性及组成的影响

陈春兰^{1,2,3}, 吴敏娜^{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, 桃源 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水稻长期定位试验为平台(28°55'49.8"N, 111°26'25.7"E), 运用 PCR、克隆文库构建等分子生物学技术研究长期单施氮肥(尿素)对亚硝化基因(*amoA* 和 *hao*) 多样性及其群落结构的影响。结果表明, 长期单施氮肥使 *amoA* 基因多样性降低(Shannon 指数减少了 11%), 而 *hao* 基因多样性几乎不受影响, 对 *amoA* 优势基因型的影响大于对 *hao* 基因的影响; 长期施用氮肥使 *amoA* 和 *hao* 基因的菌群组成分别发生了显著性($p = 0.02$)和极显著性变化($p = 0.002$)。系统发育分析表明 *amoA* 基因主要与未经培养的氨氧化细菌基因相似, 相似率主要集中在 86% ~ 99%, 可能主要来自亚硝化螺菌属; 而 *hao* 基因主要与 *Silicibacteria*、亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*) 和甲基球菌属(*Methylococcus*) 相似, 相似率在 66% ~ 80%, 长期施用氮肥使 *hao* 基因主要集中在 α -Proteobacteria 纲且与 *Silicibacteria* 有较近的亲缘关系。总体来说, 长期单施氮肥使水稻土中亚硝化基因 *amoA* 的多样性降低, 使 *amoA* 与 *hao* 的群落组成发生显著变化。

关键词: 水稻土; 氮肥; *amoA*; *hao*; 多样性

中图分类号: X171.3 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)05-1489-08

Effect of Long-Term Application of Nitrogen Fertilizer on the Diversity of Nitrifying Genes (*amoA* and *hao*) in Paddy Soil

CHEN Chun-lan^{1,2,3}, WU Min-na^{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, Taoyuan 415700, China; 3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The aim of this study was to determine the effect of long-term (16 years) application of nitrogen fertilizer on the diversity of nitrifying genes (*amoA* and *hao*) in paddy soil on the basis of long-term paddy field experimental station (started in 1990) located in Taoyuan, with the molecular approaches of PCR, constructing libraries and sequencing. The fertilizer was urea and no fertilizer was as control. The Shannon index showed that long-term application of nitrogen fertilizer made the diversity of *amoA* gene descend while no effect on the diversity of *hao* gene. The LIBSHUFF statistical analyses demonstrated that both *amoA* and *hao* libraries of CK and N treatments were significantly different from each other and the rarefaction curves of libraries failed to meet the plateaus indicating that there were lots kinds of genes haven't been detected. The results of blasting with GenBank and the phylogenetic tree showed that the *amoA* genes detected in our study had a similarity with the uncultured gene of *amoA*, which showed some similar to *Nitrosospira*. Otherwise, the *hao* genes cloned showed a relationship to the genes of cultured bacteria such as *Silicibacteria*, *Nitrosospira* and *Methylococcus*, and the *hao* genes found in the N treatment dominated in α -Proteobacteria. These results suggest that long-term fertilization of nitrogen had significant impacts on the diversity or community of *amoA* and *hao* genes.

Key words: paddy soil; nitrogen; *amoA*; *hao*; diversity

在稻田生态系统中, 氮素是水稻生长的重要营养元素, 而氮肥施入稻田后其氮素损失可达 30% ~ 75%, 且大部分氮素以分子态 N_2O 形式进入大气, 而 N_2O 是温室气体的重要组成部分。前人对稻田氮素循环的研究表明: 由硝化、反硝化细菌所引起的硝化、反硝化作用是土壤中氮素损失的重要机制之一^[1~4], 而在非淹水状态下, 硝化作用可能是 N_2O 释放的重要贡献者^[4]。硝化作用分为 2 个阶段: 一是将氨氧化成亚硝酸(盐)的亚硝化过程, 二是将亚硝酸氧化成硝酸(盐)的过程, 而前者是限速步骤, 由氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, AMO)和羟

胺氧化还原酶(hydroxylamine oxidoreductase, HAO)催化反应进行, AMO 将 NH_3 氧化为 NH_2OH , 再经 HAO 催化氧化为 NO_2^- 。其中 AMO 操纵元由 *amoA*、*amoB* 和 *amoC* 这 3 个结构基因构成^[5], 由于 *amoA* 具有一定的序列保守性, 且所编码的蛋白亚基具有氧化氨的活性位点^[6], 而被作为 AMO 功能的标记;

收稿日期: 2010-05-17; 修订日期: 2010-06-17
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: wenxuewei@isa.ac.cn

HAO 通过氧化羟胺为细胞的生长提供能量^[7].

前人对海洋、污水处理系统、旱地等环境的 *amoA* 基因的群落结构及多样性的研究比较多,而对水稻土中氨氧化细菌的研究还处于起步阶段. Oved 等^[8]的研究显示污灌过程土壤氨氧化细菌多样性发生显著的变化,亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas*)是污灌土壤的优势类群;而含肥料清水灌溉的土壤氨氧化基因多样性几乎不发生变化,亚硝化螺菌属(*Nitrospira*)是该类土壤的优势类群. Chu 等^[9]研究施肥对砂质壤土中氨氧化细菌多样性的影响发现,施用氮肥土壤的 *amoA* 基因的多样性和硝化作用强度均高于不施氮肥的土壤. 而 Colloff 等^[10]的研究显示,施用尿素的土壤中 *amoA* 基因的多样性并未见增长. 对 *hao* 基因的研究目前主要集中于分离纯菌株并从中扩增 *hao* 基因以及对功能蛋白及基因结构的研究^[7,11-13],对其在环境样品中基因多样性的研究则鲜有报道.

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,运用分子生物学手段研究探讨长期施用氮肥(尿素)对亚硝化基因 *amoA* 及 *hao* 多样性的影响,以期对氮肥合理施用提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 样品采集

1.1.1 采样点

供试土壤为第四纪红壤发育的水稻土,采自桃源农业生态站长期施肥定位试验田(28°55′49.8″N, 111°26′25.7″E). 试验始于 1990 年,共设 10 个施肥处理,各 3 个重复,实行早晚两季稻种植制度. 试验前的土壤基本肥力性状为:有机碳 14.1 g·kg⁻¹、全氮 1.78 g·kg⁻¹、全磷 0.55 g·kg⁻¹、全钾 12.6 g·kg⁻¹、速效磷 16.2 mg·kg⁻¹、速效钾 74.1 mg·kg⁻¹、pH 5.38. 本试验选择其中的 2 个处理:不施肥(CK)与施用氮肥(N);其中供试氮肥为尿素,每年施尿素约 407 kg·hm⁻².

1.1.2 土壤采集与预处理

于 2007 年 3 月 22 日采集土壤样品,每小区以 5 点法采集表层土壤(0~15 cm),快速混匀,一部分土样(约 200 g)置于液氮中运输回实验室,后经冷冻干燥机(NEOCOOLE yamato)干燥,于无菌碾钵中磨成粉末状,除去动植物残体等杂质,装入无菌离心管中保存于-70℃备用. 另一部分土样用做常规分析. 土壤样品的基本化学性状见表 1.

表 1 土壤样品的一些化学性质
Table 1 Properties of the soil samples from CK and N treatments

处理	有机质 /g·kg ⁻¹	速效磷 /mg·kg ⁻¹	速效钾 /mg·kg ⁻¹	速效氮 /mg·kg ⁻¹	NH ₄ ⁺ -N /mg·kg ⁻¹	pH (H ₂ O)
CK	31.3 ± 1.96a	5.17 ± 0.54a	33.3 ± 5.39a	144 ± 8.07a	3.35 ± 0.91a	5.17 ± 0.14a
N	31.9 ± 4.73a	5.56 ± 1.29a	30.3 ± 0.74a	153 ± 3.00a	6.07 ± 1.18b	5.17 ± 0.28a

1.2 土壤 DNA 提取

土壤 DNA 提取参考文献[14],称取 0.5 g 土壤于 2 mL 离心管,加 0.8 mL SDS 裂解液(0.25 mol/L NaCl, 0.1 mol/L EDTA, 4% SDS),涡旋混匀,68℃温育 30 min,加 0.2 mL 5 mol/L 异硫氢酸胍,混匀后 68℃温育 60 min,每 10 min 摇动一次,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入 0.125 倍体积 5 mol/L 醋酸钾和 0.42 倍体积 40% PEG8000,混匀,-20℃下沉淀 2~4 h;离心 10 min (14 000 r/min),沉淀用 0.9 mL 2 × CTAB (2% CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 0.1 mol/L EDTA)溶解,68℃温育 15 min,加等体积的氯仿:异戊醇(24:1),混匀,15 000 r/min 离心 10 min. 上清中加入 0.1 倍体积 3 mol/L NaAc 和 0.6 倍体积的异丙醇,于室温下静置 1 h,14 000 r/min 离心 10 min,沉淀物用 200 μL

75% 冰乙醇清洗 2 次,无菌台晾干. 加适量无菌水溶解 DNA 沉淀.

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 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 目的片段的扩增

通过简并引物 *amoA*-F/R (F:5′-CTG GGA YTT CTG GMT KGA CTG-3′; R:5′- AGT ARA SYT TKC CRA RRT ACC ACC A-3′) 和 *hao*-F/R (F:5′- GTM GGH TGY ATY GAC TGY CAC-3′; R:5′- GRC GRT TGG TBK TYT GDC C-3′) 分别对土壤 DNA 样品进行 PCR 扩增^[14],目的片段长度分别为 576 bp 和 805 bp.

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Promega 凝胶回收试剂盒回收纯化目的片段.

1.4 克隆与测序

纯化后的 PCR 产物连接到 PEGM-T 载体并转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。然后通过蓝白斑筛选挑取白色阳性克隆子,利用通用引物 M13F 和 M13R 进行菌液 PCR 扩增,挑选含有目的长度片段的克隆子送上海生工生物工程有限公司测序。

1.5 多样性分析

目的序列通过 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) 在线软件进行比对分析,将相似比大于 98% 的序列归为同一个操作单元 (OTU) 即同一基因型。采用 Shannon 指数,计算公式为:

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

和 Pielou 指数,计算公式为:

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

分析 *amoA* 和 *hao* 基因种群的多样性及相对密度^[15]。利用软件 PHYLIP (3.67) 绘制稀疏曲线,比较各文库菌类的丰富度,同时计算文库的库容值,计算公式为:

$$[1 - (n/N)] \times 100\%$$

式中, P_i 为同一种 OTU 的克隆数占总克隆数的比例, S 为不同 OTU 的种类数, n 为含单个克隆的 OTU 数, N 为总克隆数^[15]。

1.6 文库组成差异性分析

利用 LIBSHUFF 软件 (<http://LIBSHUFF.mib.uga.edu/>) 比较 2 个处理克隆文库间功能微生物组成的差异。此软件以 95% 为置信度,即:如果 $p < 0.05$,说明 2 个文库间基因组成存在显著性差异, $p > 0.05$ 则说明 2 个文库间基因组成没有显著性差异^[16]。

1.7 系统发育树分析

通过 Mega (4.0) 软件对各 OTU_s 进行碱基序列的多重比对,并利用邻接法 (Neighbor- Joining) 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 多样性指数分析

Shannon 指数、Pielou 指数,分别评价土壤微生物的多样性和均匀度。本试验每个文库测 70 个含目的基因片段的克隆子,对文库分析结果见表 2。从表 2 中数据得出长期施用氮肥减少了 *amoA* 的多样性 (Shannon 指数降低了 11%),而 *hao* 基因的多样性几乎没有变化。同时,长期施用氮肥对这 2 个基因的均匀度也有类似的影响,使 *amoA* 基因的均匀度降低,而 *hao* 基因几乎不受影响。

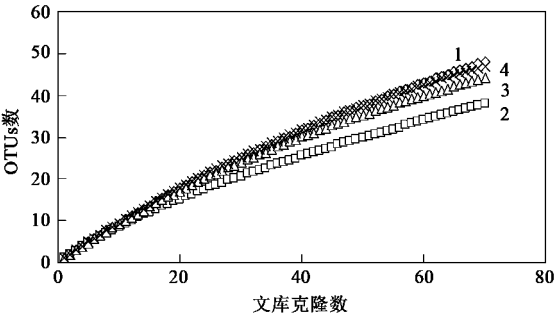
表 2 *amoA* 与 *hao* 基因在 CK 和 N 处理文库中的多样性

基因处理	<i>amoA</i>		<i>hao</i>	
	CK	N	CK	N
克隆子	70	70	70	70
可操作分类单元数目	48	38	44	47
Shannon 指数	3.74	3.34	3.64	3.74
均匀度指数	0.97	0.92	0.96	0.97

2.2 稀疏曲线分析及基因库容估计

运用稀疏法来估计样品中物种丰富度,稀疏法假定克隆筛选满足随机、充分的条件,在此基础上构建的物种稀疏曲线将出现渐近拐点或者渐近线,即随着克隆样本的增加,菌种丰富度将保持不变或增加很少。图 1 中包含了 *amoA*、*hao* 这 2 个基因在 CK、N 两处理中的 4 条稀疏曲线,反映的多样性情况与 Shannon 指数的结果基本一致。此外,这 4 条稀疏曲线均未达到平台期,说明在这 2 种施肥处理水稻土中 *amoA* 与 *hao* 的多样性比较高。

库容值表征样品中微生物物种的覆盖程度。通过公式计算出 *amoA* 基因在 CK 和 N 处理中的库容值分别为 51% 和 60%;*hao* 基因的库容值分别为 61% 和 59%。说明所测序到的基因超过总库的一半,能代表土壤中多数含 *amoA* 及 *hao* 基因的硝化细菌的情况。



1. 表示 CK 处理中 *amoA* 稀疏曲线; 2. 表示 N 处理中 *amoA* 稀疏曲线; 3. 表示 CK 处理中 *hao* 稀疏曲线; 4. 表示 N 处理中 *hao* 稀疏曲线

图 1 *amoA*、*hao* 基因分别在 CK、N 两处理中的稀疏曲线
Fig. 1 Rarefaction curves of *amoA* and *hao* genes from the CK and N treatments

2.3 文库组成的差异性分析

由 LIBSHUFF 分析结果显示:*amoA* 基因菌群结构在 CK 和 N 处理文库中达到显著性差异 ($p = 0.02$),而 *hao* 基因菌群结构在这 2 个处理文库间达到极显著差异 ($p = 0.002$)。图 2 中同源覆盖曲线与异源覆盖曲线之间的差异也说明了文库间的差异

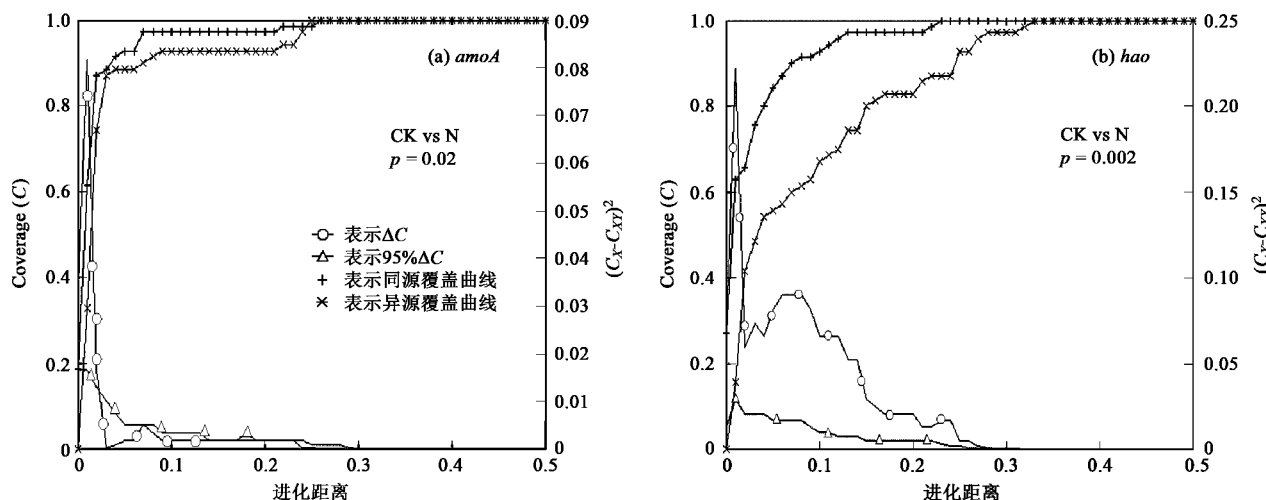


图2 *amoA*、*hao* 的 LIBSHUFF 比较结果图

Fig. 2 Results of selected LIBSHUFF comparisons about *amoA* and *hao* genes libraries

性,两曲线相似性很小,文库间的差异性很大. 这说明长期单施氮肥使含 *amoA* 和 *hao* 功能基因的细菌群落结构发生了显著性改变.

通过图 2 进一步分析 *amoA*、*hao* 分别在 CK、N 两处理中差异性情况. 对于 *amoA* 基因文库,大约在 0.03 的进化距离处 ΔC (同源库容与异源库容的差异值^[15,16])开始 $< 95\% \Delta C$,说明如果按 0.03 以及更大的进化距离为标准来划分 OTU_s,则 *amoA* 菌群结构在 CK 和 N 这 2 个文库中不存在显著性差异;而 *hao* 基因在 < 0.3 的进化距离内 ΔC 均大于 $95\% \Delta C$,说明在 < 0.3 的进化距离内 *hao* 基因菌群结构在 CK 和 N 这 2 个文库中存在显著性差异,这也说明按常用的 OTU_s 划分标准 (95% ~ 99%),*hao* 基因菌群结构在这 2 个文库中均存在差异,进而说明长期氮肥的施用使 *hao* 基因菌群发生了显著变化.

2.4 序列分析

与 GenBank 中的亚硝化基因比对结果显示,本试验获得的 *amoA* 基因多与未培养的硝化细菌的基因有较大相似性,相似率集中在 86% ~ 99% 之间. *hao* 基因则主要与已培养的细菌有较近的亲缘关系,但相似性相对较低,主要在 66% ~ 80% 之间. 比对结果显示获得的 *hao* 基因多与已知菌属 *Silicibacteria*、亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*)、甲基球菌属 (*Methylococcus*) 相似.

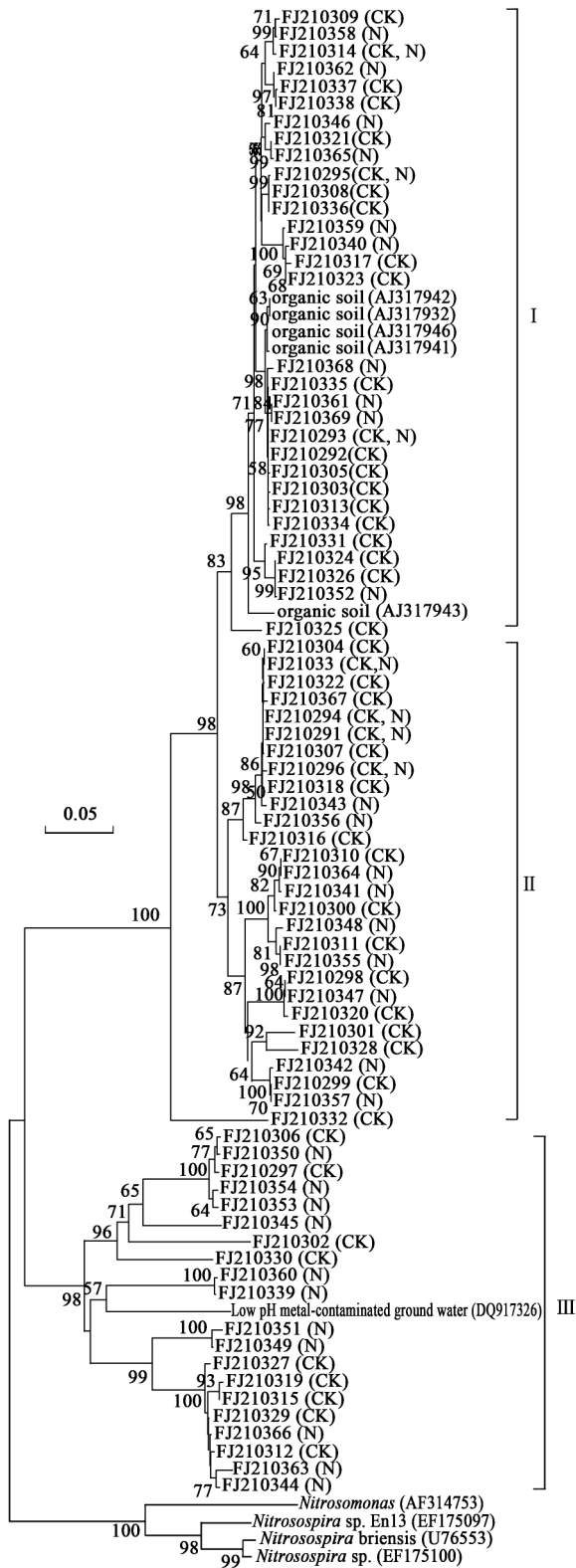
根据克隆子数量占总克隆子数比例 $> 5\%$ 的 OTU_s 为该菌群优势菌群,3.0% ~ 4.5% 之间的 OTU_s 为次要优势菌群的划分原则,含 *amoA* 基因的菌群中共出现了 7 个优势菌群,其中有 6 个优势菌

群来自 N 处理,而含 *hao* 基因的菌群中出现了 3 个优势菌群,其中 CK 处理出现了 2 个. *AmoA* 和 *hao* 基因在 CK 和 N 处理的文库中均出现了重叠基因 (在 2 个处理中都有分布的菌种),但没有相同的优势或次优势菌群出现. 长期氮肥的施用改变了优势菌群的种类,并且对含 *amoA* 基因的优势菌群影响更大.

2.5 系统发育树分析

与 GenBank 中的序列比对结果显示 *amoA* 基因在这 2 个处理中与未培养的氨氧化菌基因以及 *amoA/pmoA* 基因有最高相似性,从系统发育树图中也能得到类似结果 (图 3),树图的外源基因为 β -Proteobacteria 中常见的 *Nitrosospira* 和 *Nitrosomonas*. 根据系统发育树图的结构将获得的 *amoA* 基因划分为 3 个簇,第一个簇最大,占总 OTU_s 数的 40%,其中 CK 处理在此簇占优势 (62%),另外,这一簇与来自有机质土壤的 *amoA/pmoA* 基因 (AJ317932、AJ317943 等)有较近的亲缘关系 (见图 3),相似率为 93% ~ 99%. III 中施氮肥的 OTU_s 数略多于不施肥处理 (约多 20%),这一簇同序列号为 DQ917326 来自地下水的 *amoA* 基因相聚一簇. 比对结果显示与 *amoA* 最相近的虽然为未知菌,但是与其最相近的已知菌属为亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*),由此推论本试验克隆到的氨氧化细菌有可能属于亚硝化螺菌属.

根据系统发育树图结构分析,获得的 *hao* 基因可被分成 3 个类群 (图 4),由变形菌门 (Proteobacteria) 的 3 个纲 (α 、 β 、 γ) 组成. 第一个类



CK 表示来自对照处理文库的基因,N 表示来自施用尿素处理文库的基因,FJ210 *** 等表示登录号,斜体为已知菌属或者已报道的基因序列,树根只显示了 >50% 以上的值,下同

图 3 水稻土中长期不施肥和单施氮肥土壤中 *amoA* 基因的系统发育树图

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

群即 α -Proteobacteria 类群包含的 OTU_s 最多,其涵盖了 N 处理中 85.1% 的 OTU_s (40 个 OTU_s),CK 处理中 50% 的 OTU_s (22 个 OTU_s),在 *hao* 基因克隆文库中占优势. 第二个类群即 β -Proteobacteria 主要来自于 CK 处理 (见图 4B), 只有一个 OTU 来自 N 处理 (FJ493740), 另外类群 II 中的这几个基因的比对结果虽与 *Nitrosospira* 有一定的亲缘关系,但树图结构

显示它们可能属于不同的属 (图 4). 与类群 II 类似,从 CK 处理所获得 *hao* 基因在 γ -Proteobacteria 纲 (类群 III) 中占优势,其 OTU_s 数是 N 处理的 2 倍多. 这些说明长期施用尿素使 *hao* 基因主要集中在 α -Proteobacteria, 且与 *Silicibacteria* 菌属亲缘关系较近,而在其它 2 个变形菌纲中数量相对较少.

以 98% 的进化距离标准界定 OTU_s 所获得基因

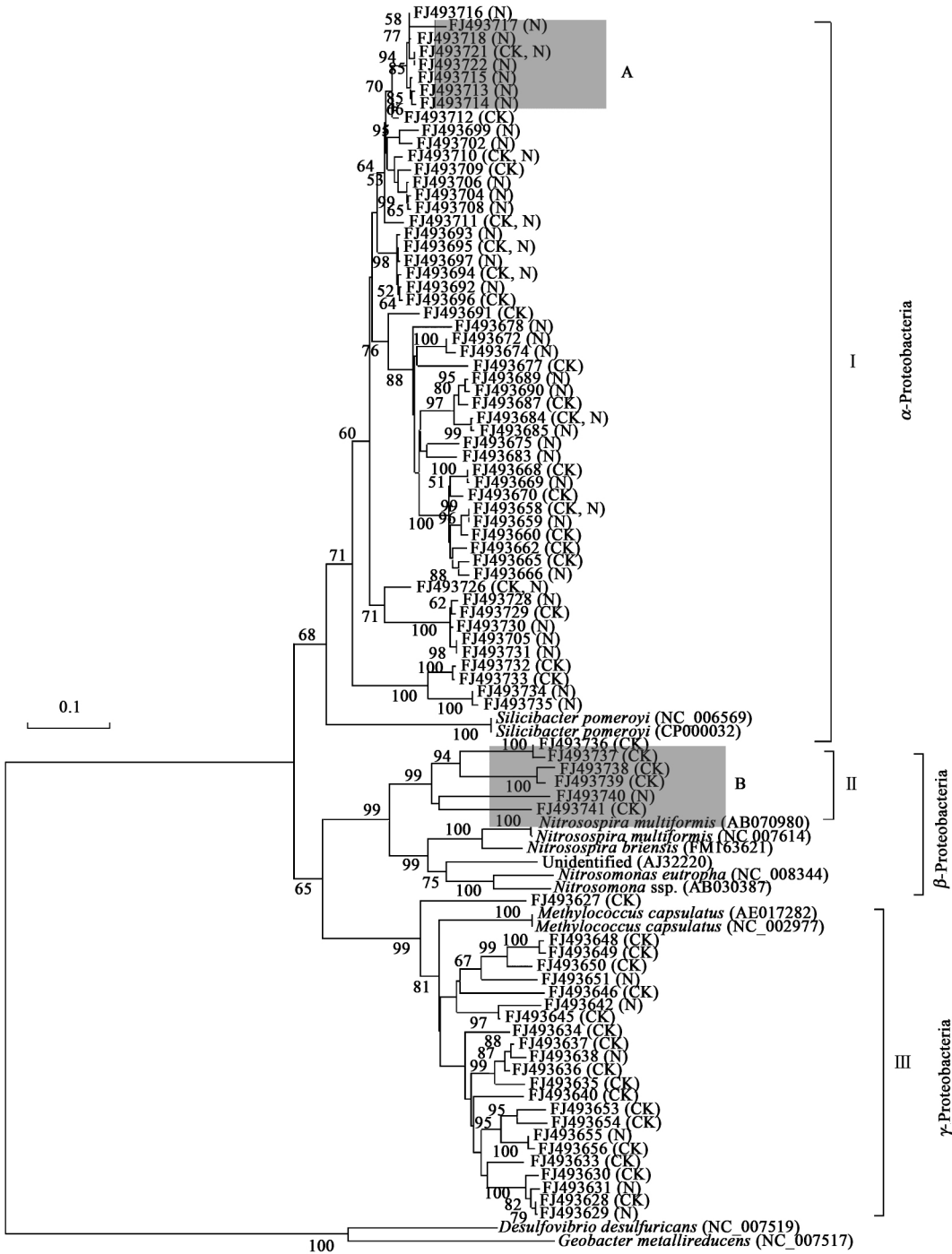


图 4 水稻土中长期不施肥和单施氮肥土壤中 *hao* 基因的系统发育树图
Fig. 4 Phylogenetic tree of *hao* from two fertilization treatments in a paddy soil

种类的聚类情况出现较少(图4中阴影部分表示聚类)。amoA中几乎不能分辨出聚类现象即CK和N这2个文库中的基因在发育树图中频繁交替出现。然而hao基因树图中每个类群都存在比较明显的优势文库,如第一个类群中N文库占优势;其聚类现象也比较明显,出现了2个聚类块(图4A和4B)。因此,长期施用氮肥对hao基因群结构的影响明显大于amoA基因群。

3 讨论

Shen等^[17]的研究显示长期施用氮肥的土壤中amoA的多样性指数比对照高,认为长期施用氮肥硫酸铵引起铵态氮增加以及土壤pH降低是导致硝化细菌多样性升高的主要原因。钟文辉等^[18]分析显示硝化作用与pH不呈现显著相关关系。本研究中施用的氮肥为尿素,长期施用没有引起水稻土pH降低(表1),而amoA的多样性指数降低,说明稻田土壤中含amoA的功能微生物总群多样性在一定程度上受到铵态氮增加的影响。He等^[19]在长期施肥处理对旱地红壤氨氧化细菌多样性影响的研究中也报道N处理中的amoA多样性低于CK处理。土壤中高浓度的铵对氨氧化细菌的生长有抑制作用^[20,21]。由于长期施用尿素,土壤中铵态氮含量是不施肥对照的2倍,高的铵态氮含量可能是导致amoA多样性指数降低的重要原因之一。与amoA基因情况不同,hao基因的多样性几乎未受到尿素处理的影响,而优势基因型数目在尿素的作用下略微降低,具体原因还不清楚。

Wang等^[22]对淹水水稻田不同部分及不同施氮肥量进行研究,结果显示所检测到的基因主要分布在*Nitrosomonas communis*、*Nitrosospira* cluster 3a和3b这3个类群中,并且与*Nitrosomonas*相似的基因占多数,该类群在有氧或微氧状态土壤中丰度高于厌氧非根际土壤,而与*Nitrosospira*相似的基因的丰度随着施用氮肥浓度的增加而减少。Bowatte等^[23]对水稻田氧化层土壤进行研究,PCR扩增结果显示AOB的产量比较低,测序结果显示所有DNA序列都与*Nitrosospira*相似且分布于cluster 1中,未检测到与*Nitrosomonas*相似的amoA基因。本研究中检测到的amoA基因主要与未知菌基因相似,虽然比对结果显示可能属于*Nitrosospira*,但是目前没找到依据将其按传统分类法^[24]来界定所属Cluster,可能原因是这些基因已超出了原有的界定范围。

尿素的施用使水稻土中氨氧化基因(amoA)的

优势基因发生了明显的变化,不仅种类不同于对照处理,且数量上是不施肥处理的6倍,可能是由于N素的加入,促进有机质的分解以及细菌的生长繁殖^[25],使优势菌群更加显著。郝永俊等^[26]报道铵浓度是决定氨氧化菌种群结构的主要因素之一,Hastings等^[27]研究报道自养氨氧化细菌是土壤氮素循环的重要组成部分,其活性受到外加氮肥的影响。本研究中外加氮肥尿素的施用可能增加了某些氨氧化细菌的活性,促进优势种繁衍。优势类群分析显示长期尿素施肥对amoA优势基因的影响大于hao基因,这可能是因为长期尿素施用引起的土壤理化性质的变化(尤其是 NH_4^+ 浓度的变化)对amoA的直接影响较大。

本研究克隆到的与*Silicibacter*属相似的hao基因在系统发育树中占优势,并且在N处理文库中的OTUs多于CK文库,原因可能是*Silicibacter pomeroyi*既能同化铵又能同化尿素^[12],尿素的加入使底物范围扩大而增加了多样性。前人对hao基因的多样性影响鲜见报道。

本试验建立的4个文库的库容值相对比较小,稀疏曲线均未达到平台期,但文库克隆数是一些研究中文库克隆数的2~3倍^[28],推测水稻土中含有的亚硝化基因多样性可能比较高。没有达到平台期的原因也可能是与本研究采用随机筛选克隆的方法有关,通常使用的DGGE、RFLP等方法筛选差异性核苷酸序列可能排除了一些亲缘关系比较相近的菌种^[29],以及某些基因因数量少不能在凝胶上出现明显条带而被忽略,比如Muyzer等^[30]指出DGGE法只能对微生物群落中数量上>1%的优势种群进行分析,从而造成较少的OTUs也能到达稀疏曲线平台期的假象。这也说明我们采用的直接测序法能比较好的反映多样性与库容,反映了自然界微生物种类繁多的客观事实^[25]。

4 结论

长期单施氮肥使amoA基因的多样性降低而hao基因的多样性几乎未受影响;同时使amoA基因群落组成出现了显著差异并增加了优势基因数量,使hao基因群落组成达到极显著差异而对优势基因数量影响不明显。

参考文献:

- [1] Reddy K R, Patrick Jr W H, Lindau C W. Nitrification-denitrification at the plant root-sediment interface in wetlands [J]. Limnology and Oceanography, 1989, 34(6): 1004-1013.

- [2] 蔡贵信,朱兆良,朱宗武,等.水稻田中碳铵和尿素的氮素损失的研究[J].土壤,1985,**17**:225-229.
- [3] Reddy K R, Patrick Jr W H. Denitrification losses in flooded rice fields[J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 1986, **9**(1-2): 99-116.
- [4] 侯爱新,王正平.稻田 CH₄ 和 N₂O 排放关系及其微生物学机理和一些影响因子[J].应用生态学报,1997,**8**(3):270-274.
- [5] Alzerreca J J, Norton J M, Klotz M G. The amo operon in marine, ammonia-oxidizing γ -proteobacteria [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, **180**(1): 21-29.
- [6] Stephen J R, Chang Y J, Macnaughton S J, *et al.* Effect of toxic metals on indigenous soil beta-subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, **65**(1): 95-101.
- [7] Hommes N G, Sayavedra-Soto L A, Arp D J. The roles of the three gene copies encoding hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*[J]. Archives of Microbiology, 2002, **178**(6):471-476.
- [8] Oved T, Shaviv A, Goldrath T, *et al.* Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67**(8):3426-3433.
- [9] Chu H Y, Fujii T, Morimoto S, *et al.* Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, **73**(2): 485-491.
- [10] Colloff M J, Wakelin S A, Gomez D, *et al.* Detection of nitrogen cycle genes in soils for measuring the effects of changes in land use and management[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, **40**(7): 1637-1645.
- [11] Shinozaki H, Fukui M. Comparison of 16S rRNA, ammonia monooxygenase subunit A and hydroxylamine oxidoreductase gene, in chemolithotrophic ammonia-oxidizing bacteria [J]. Journal of General and Applied Microbiology, 2002, **48**(3): 173-176.
- [12] Moran M A, Buchan A, González J M, *et al.* Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment[J]. Nature, 2004, **432**(12): 910-913.
- [13] Poret-Peterson A T, Graham J E, Gulledge J, *et al.* Transcription of nitrification genes by the methane-oxidizing bacterium, *Methylococcus capsulatus* strain Bath [J]. Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 2008, **2**(7): 1213-1220.
- [14] 陈春兰,陈哲,朱亦君,等.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[J].环境科学,2010,**31**(6):1624-1632.
- [15] Hughes J B, Bohannon B J M. Application of ecological diversity statistics in microbial ecology [M]. (2nd Edition). Molecular Microbial Ecology Manual, 2004. 1321-1344.
- [16] Singleton, D R, Furlong, M A, Rathbun, S L, *et al.* Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67**(9): 4374-4376.
- [17] 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]. Environmental Microbiology, 2008, **10**(6): 1601-1611.
- [18] 钟文辉,蔡祖聪,尹力初,等.种植水稻和长期施用无机肥对红壤氨氧化细菌多样性和硝化作用的影响[J].土壤学报,2008,**45**(1):105-111.
- [19] 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.
- [20] Suwa Y, Sumino T, Noto K. Phylogenetic relationships of activated sludge isolates of ammonia oxidizers with different sensitivities to ammonium sulfate [J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1997, **43**(6): 373-379.
- [21] Suwa Y, Imamura Y, Suzuki T, *et al.* Ammonia-oxidizing bacteria with different sensitivities to (NH₄)₂SO₄ in activated sludges[J]. Water Research, 1994, **28**(7): 1523-1532.
- [22] Wang Y, Ke X B, Wu L Q, *et al.* Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rice field soil as affected by nitrogen fertilization [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2009, **32**(1): 27-36.
- [23] Bowatte S, Jia Z J, Ishihara R, *et al.* Molecular analysis of the ammonia oxidizing bacterial community in the surface soil layer of a Japanese paddy field [J]. Soil Science & Plant Nutrition, 2006, **52**(4): 427-431.
- [24] 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.
- [25] 黄昌勇.土壤学[M].北京:中国农业出版社,2000.34-38.
- [26] 郝永俊,吴松维,吴伟祥,等.好氧氨氧化菌的种群生态学进展[J].生态学报,2007,**27**(3):1573-1582.
- [27] Hastings R C, Ceccherini M T, Miclaus N, *et al.* Direct molecular biological analysis of ammonia oxidizing bacteria populations in cultivated soil plots treated with swine manure[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1997, **23**(1): 45-54.
- [28] Hunter E M, Mills H J, Kostka J E. Microbial community diversity associated with carbon and nitrogen cycling in permeable shelf sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**(9): 5689-5701.
- [29] Liu B R, Jia G M, Chen J, *et al.* A review of methods for studying microbial diversity in soils[J]. Pedosphere, 2006, **16**(1): 18-24.
- [30] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A C. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encode for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, **59**(3): 695-700.