

过量施肥下氮素形态对旱地土壤细菌多样性的影响

王保莉¹, 岑 剑¹, 武传东¹, 曲 东^{2,3*}

(1.西北农林科技大学生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2.西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100; 3.黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:采用细菌 16S rDNA 的 PCR-RFLP 技术,以西北地区土垫旱耕人为土为材料,模拟田间过量施肥水平,经室内恒温短期培养,研究了过量施肥下酰胺态氮、硝态氮和铵态氮对土壤细菌多样性的影响。结果显示:PCR-RFLP 分析酰胺态氮(T1)、硝态氮(T2)和铵态氮(T3)过量施肥处理的细菌 16S rDNA 克隆文库,分别得到 17、25 和 130 个酶切分型,不施肥对照(CK1)和正常施肥对照(CK2)分别得到 119 和 187 个酶切分型,表明正常施肥处理的酶切分型最多,过量使用酰胺态氮和硝态氮减少了酶切类型,而过量施用铵态氮可以维持与不施肥对照相近的酶切类型数量。采用 α 多样性测度对试验结果进行分析统计表明,不同处理间土壤细菌的多样性指数(H' 、 D_s)和物种丰富度指数(d_{Mk})均为 CK2>T3>CK1>T2>T1 处理,表明合理施肥可显著增加土壤中细菌的多样性,而过量施用酰胺态氮则减少细菌的多样性,使用铵态氮处理可维持细菌多样性;除正常施肥对照(CK2)外,其余各处理都出现了优势菌种。通过对优势菌的 16S rDNA 序列比对发现,酰胺态氮处理都为未培养细菌,硝态氮处理和铵态氮处理的优势菌呈现了菌属多样性,前者包括变形菌门的假单胞菌属和寡养单胞菌属、芽单胞菌门的未培养芽单胞菌属和未培养土壤细菌,后者为未培养酸杆菌属、变形菌门寡养单胞菌属和厚壁菌门芽孢杆菌属,表明不同施肥方式改变了土壤细菌的群落结构。

关键词:土垫旱耕人为土;细菌多样性;过量施肥;氮素形态;PCR-RFLP

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)07-1351-06

Effects of Nitrogen Form on Bacterium Diversity in Excessive Fertilization Dryland Soil

WANG Bao-li¹, CEN Jian¹, WU Chuan-dong¹, QU Dong^{2,3*}

(1.College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 2.College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 3.State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on Loess Plateau, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Soil microbial community is often affected by type and level of fertilization. To analyze the potential impacts of different nitrogen forms on bacterial community in Earth-cumuli-Orthic Anthrosols in northwest China, short-term indoor thermostatic incubations including treatments of excessive amide-nitrogen(T1), nitrate-nitrogen(T2) and ammonium-nitrogen(T3) were performed and their responding bacterial 16S rDNA libraries were then constructed and analyzed by PCR-RFLP, as well as controls without fertilization(CK1) and with normal fertilization (CK2). According to the fingerprints generated by restrict cleaving with endonuclease *Hha* I and *Rsa* I and agarose gel electrophoresis, we obtained 17, 25, 130, 119 and 187 OTUs (Operational Taxonomic Units) from the established libraries of treatments T1, T2, T3 and controls of CK1 and CK2, respectively. Results showed that normal fertilization triggered the appearance of the most OTUs while excessive utilization of amide-nitrogen and nitrate-nitrogen reduced the OTUs to approximately 9.09% and 13.36% of that of normal fertilization, whereas over usage of ammonium-nitrogen generated a similar OTU numbers as the control without fertilization. Estimation by α indices gave a decreasing order of both diversity(indices of Shannon-wiener and Simpson, H' and D_s) and richness(index of Margalef, d_{Mk}) of all incubations as CK2>T3>CK1>T2>T1, indicating that normal fertilization was beneficial to the bacterial diversity in our study while excessive amide-nitrogen treatment decreased it and ammonium-nitrogen overusing maintained the bacterial diversity on a moderate level. In addition, we observed the presence of dominant pattern in all the incubations except for control with normal fertilization. As shown by phyloge-

收稿日期:2010-12-03

基金项目:黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室基金(10501-178)

作者简介:王保莉(1960—),陕西西安人,博士,教授,主要从事土壤微生物多样性研究。E-mail:wbl@nwsuaf.edu.cn

* 通讯作者:曲 东 E-mail:dongqu@nwsuaf.edu.cn

netic analysis of evolutionary distance, dominant clones from T1 entirely fell into the radiation of uncultured bacteria, while the distributions of *Pseudomonas* sp. *Stenotrophomonas* sp., uncultured *Gemmatimonadetes* sp., and uncultured soil bacterium were found in T2 and clones from T3 were closely affiliated to uncultured *acidobacterium* sp. *Stenotrophomonas* sp. and *Bacillus* sp. The variation of bacterial diversity, driven by different fertilizing manners of nitrogen, was proofed in our present study in molecular approach.

Keywords: Earth-cumuli-Orthic Anthrosols; bacterium diversity; excessive fertilization; nitrogen forms; PCR-RFLP

土壤微生物群落结构是土壤生态功能的基础,它与土壤的化学性质、土壤团聚体的形成以及土壤污染物的降解等密切相关^[1]。Jon^[2]在 *Nature* 杂志上指出,生态学正走向地下,如果忽视土壤环境中生物多样性及其生态功能研究,将是令人担忧的。Prosser 等^[3]综述了土壤微生物生态理论研究的重要意义。因此,揭示土壤微生物生态变化与环境之间的相互关系已成为目前的研究热点。施肥是影响土壤质量及其可持续利用的重要农业措施之一^[4]。由于肥料施用方式(施用量、长期施用或短期施用)、土壤类型和利用方式等因素的影响^[5-6],使得施肥对土壤微生物多样性的影响非常复杂,相关的报道结论不一^[7],反映出这方面的研究还有待进一步深化。目前,国内针对黄土高原旱地土壤中微生物群落多样性与土壤肥力关系的研究相对滞后,亟待加强。因此,本文拟以西北地区旱地土壤为研究对象,采用 PCR-RFLP 技术,以期探讨过量施肥时不同氮肥形态与旱地土壤细菌多样性的关系,从而为合理施肥、避免生态破坏、改善农业环境提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

土壤样品于 2006 年 10 月采集于陕西杨凌西北农林科技大学农作一站收获后的大田,属于土垫旱耕人为土(Earth-cumuli-Orthic Anthrosols),前茬作物为玉米。土壤基本理化性质参见文献[8]。

1.2 土壤样品处理

按照施肥方式设置 5 个处理。CK1 为未施肥对照,CK2 为正常施肥水平对照,按 N:P₂O₅:K₂O 为(5.6×10⁴ kg·km⁻²):(4.2×10⁴ kg·km⁻²):(8.4×10⁴ kg·km⁻²)设置,氮肥为尿素,磷肥为 KH₂PO₄,钾肥为 KCl。其余 3 个处理(T1、T2 和 T3)为 10 倍正常施氮水平处理,其中 T1 为施尿素处理,T2 为施硝酸钠处理,T3 为施碳酸氢铵处理。将化肥与土壤混匀,按照维持土壤水分为最大毛管持水量的 80%的原则,控制加水量为 27.27%。将土样置于 100 mL 塑料离心管中,于 28 ℃ 恒温培养箱中避光培养 15 d,每日称重补水,每个处

理设置 5 个平行。

1.3 土壤细菌群落多样性的 PCR-RFLP 分析

1.3.1 土壤总 DNA 提取

参考文献[8]方法提取土壤样品总 DNA。

1.3.2 细菌 16S rDNA 片段的扩增与克隆文库的构建

采用细菌 16S rDNA 通用引物 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3')和 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') 扩增土壤细菌 16S rDNA 片段。PCR 扩增体系同文献[8]。扩增产物与 pMD19-T 载体连接后转化到大肠杆菌 JM109, 建立土壤细菌 16S rDNA 克隆文库。采用蓝白斑筛选阳性克隆子。

1.3.3 RFLP 分析

在有大于 500 个克隆子的文库中随机挑取阳性克隆,用 pMD19-T 载体通用引物 M13(-47)和 M13(-48)进行菌体 PCR,扩增插入的细菌 16S rDNA 片段。PCR 产物分别用 *Hha* I 和 *Rsa* I 限制性内切酶消化,酶切产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳后,溴化乙锭染色,分析 RFLP 带型图谱。每一种带型作为一个分类操作单位(OTU, Operational Taxonomic Unit)^[1,9]。挑选各处理的优势菌种由上海生工生物工程有限公司测定序列,用 CHECK-CHIMERA 程序进行嵌合序列鉴定^[10],对非嵌合序列做 BLAST 比对以确定优势细菌的亲缘关系。

1.3.4 数据分析

通过 RFLP 统计的数据,计算各处理的土壤细菌多样性指数^[11]。用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树。用 SPSS Statistics 17.0 软件的欧氏距离法作系统聚类图。

2 结果与分析

2.1 细菌 16S rDNA 克隆文库的 RFLP 酶切图谱分析

每个处理随机挑取约 200 个阳性克隆进行菌落 PCR,纯化后分别用 *Hha* I 和 *Rsa* I 消化,其部分酶切结果如图 1 所示。5 个处理的克隆文库经 *Rsa* I 酶和 *Hha* I 酶切产生的 RFLP 类型统计结果见图 2。在 5 种不同处理中,正常施肥处理(CK2)产生的酶切类型(OTUs)最多,达 187 种;其次为施铵态氮肥处理(T3),为 130 种;未施肥对照(CK1)为 113 种;硝态氮处理

(T2)为25种;酰胺态氮处理(T1)为17种。表明正常施肥处理的酶切分型最多,过量使用酰胺态氮和硝态氮减少了酶切类型(分别仅为正常施肥处理的9.09%和13.36%),而过量施用铵态氮可以维持与不施肥对照相近的酶切类型数量。出现一次的酶切类型,即单一克隆所占比例由多到少依次为CK2(81.55%)、T3(45.85%)、CK1(40.0%)、T2(7.37%)和T1(2.84%)。以OTUs>5作为优势菌种界定时,除CK2外其余4个处理中存在不同的优势菌种。CK1的优势菌分别占5.13%、3.08%、1.54%、2.56%和2.56%;T1的优势菌分别占34.6%、29.38%、12.8%、8.53%和2.84%;T2的优势菌分别占21.58%、18.42%、14.21%、13.16%、8.95%、4.21%、3.68%和3.16%;T3的优势菌分别占6.83%、3.41%、3.41%、2.93%、2.44%和2.44%。

2.2 细菌16S rDNA克隆文库酶切类型多样性指数分析

对5个处理的细菌16S rDNA克隆文库酶切类型进行了多样性指数分析,结果见表1。土壤细菌的丰

度指数(d_{Ma})、多样性指数(H' 、 D_s),排序为CK2>T3>CK1>T2>T1。过量施肥下,铵态氮处理的土壤细菌的物种丰富度、多样性和均匀度大于其他两种氮肥类型的,而酰胺态氮处理的多样性最差。正常施肥处理CK2比过量施氮肥T1处理的丰富度(d_{Ma})高11.67倍,比T2处理高7.63倍,而比T3处理仅高1.44倍,表明过量施用铵态氮可以保持土壤细菌的丰富度,而施用过量的酰胺态氮和硝态氮降低了细菌多样性。不同处理间的丰富度(d_{Ma})、香农指数(H')、辛普森指数(D_s)和均匀度(E)等多样性指数的变异系数分别为76.82%、40.82%、11.16%和17.34%。可以看出,这些指数作为度量不同施肥处理土壤的细菌种群构成的参数,其差异比较显著,其中不同处理间的丰富度(d_{Ma})的变异系数值最大,表明从群落丰富度的角度比较不同处理间的差异是本试验中较为敏感的指标。

基于 α 测度的4种多样性指数,用欧氏距离法对影响细菌群落多样性的不同施肥处理土壤类型作

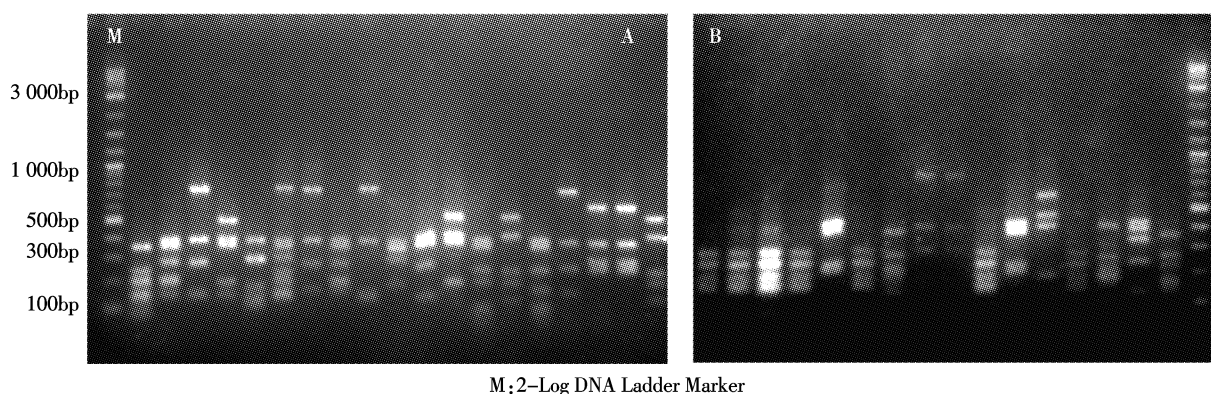


图1 细菌16S rDNA的Hha I (A)和Rsa I (B)部分酶切图谱

Figure 1 Partial RFLP patterns of soil bacterial 16S rDNA digested by *Hha* I (A) and *Rsa* I (B)

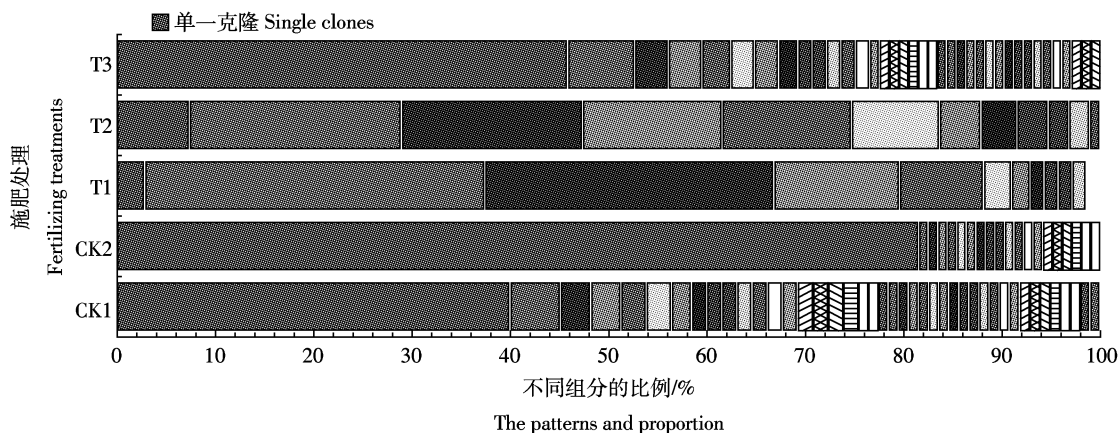


图2 5种施肥处理土样细菌16S rDNA的RFLP统计结果

Figure 2 Statistic results of RFLP of soil bacterial 16S rDNA in five fertilization treatments

表 1 各土壤样品中细菌 16S rDNA 克隆文库的 *Hha* I -*Rsa* I 酶切类型的多样性指数Table 1 Diversity indices based on *Hha* I -*Rsa* I RFLP phlotypes in 16S rDNA clone libraries from five soil treatments

处理 Treatments	库容值 Coverage(C)	丰富度 Richness(d_{Ma})	香农指数 Shannon-wiener index(H')	辛普森指数 Simpson index(D_s)	均匀度 Evenness(E)
CK1	0.60	22.38	4.58	0.987	0.985
CK2	0.18	34.91	5.23	0.999	0.908
T1	0.97	2.990	1.83	0.768	0.646
T2	0.93	4.574	2.36	0.868	0.734
T3	0.54	24.23	4.61	0.985	0.946

聚类分析,结果如图 3。由图 3 可以看出:T1 与 T2 处理的欧氏距离为 1.68 时,不同施肥处理土壤中细菌群落组成类型趋于一类,趋同性最强;CK1 与 T3 处理的欧氏距离达到 1.85 时,细菌群落组成类型趋于一类,但均与 CK2 处理的趋同性较弱。

2.3 优势细菌的种属分析

对各个处理中产生的 24 个优势克隆测定了部分 16S rDNA 序列,其中有一条为嵌合序列。该嵌合序列为 CK1 中占 3.08% 的优势菌种。将其余 23 条序列(在 GenBank 上的登录号为 FJ868844~FJ868866)与 GenBank 中登录的序列比较,确定它们的种属关系,将其中 16 条序列构建了系统发育树见图 4。可以看出,CK1 中的优势菌种属于酸杆菌门(*Acidobacteria*)的未培养酸杆菌属(*Uncultured acidobacterium* sp);4 个 T1 优势菌种属于未培养土壤细菌(*Uncultured soil bacterium*),1 个与未培养的酸杆菌属聚在一起;T2 的优势菌种分别与芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)的未培养芽单胞菌属(*Uncultured Gemmatimonadetes* sp)、变形菌门(*Proteobacteria*)的假单胞菌属(*Pseudomonas* sp)和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp)以及未培养土壤细菌聚在一起。除了优势菌 T3-60 外, T3-148、T3-004 和 T3-028 优势菌分别属于未培养的

酸杆菌属、变形菌门寡养单胞菌属和厚壁菌门(*Firmicutes*)的芽孢杆菌属(*Bacillus* sp)。

上述结果显示,T2 和 T3 处理的优势菌呈现了多样性,不同施氮类型改变了土壤优势细菌的群落组成。

3 讨论

本试验用 RFLP 技术和多指数分析,以不施肥和正常合理施肥处理为对照,探讨了过量施用化肥下,酰胺态氮、硝态氮和铵态氮 3 种氮肥对室内模拟短期培养条件下土壤样品中细菌分型的影响。过度施用化肥不仅降低农产品品质,还给环境带来严重污染^[12]。土壤作为被施对象,其中的生物必然会受到影响。土壤微生物以细菌居多,它们在肥料的微生物利用和转化中起着重要的作用,也必然对过度施肥和不同类型肥料具有响应。从本实验的土壤细菌和多样性指数结果可以看出,不同施肥水平处理(CK1、CK2 和 T1)中土壤细菌群落和多样性具有明显差异,其中合理配施尿素处理(CK2)土壤细菌的 RFLP 分型和多样性最高,而过度使用尿素处理(T1)的多样性显著下降,表明合理施肥量对保持土壤细菌群落稳定和多样性具有重要意义,与我们前期结果一致^[13]。

在过量施用化肥前提下,比较了酰胺态氮、硝态

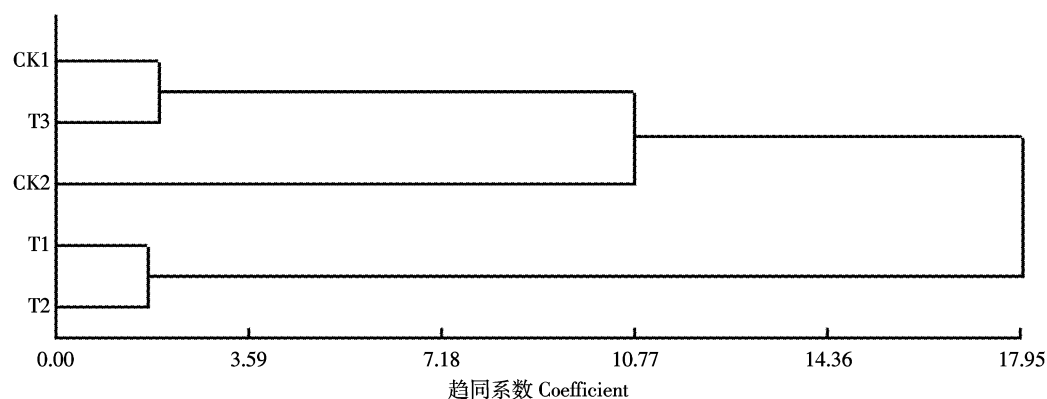


图 3 不同施肥处理土壤细菌欧氏距离聚类图

Figure 3 Rescaled distance matrix tree of bacterial from different fertilization treatments

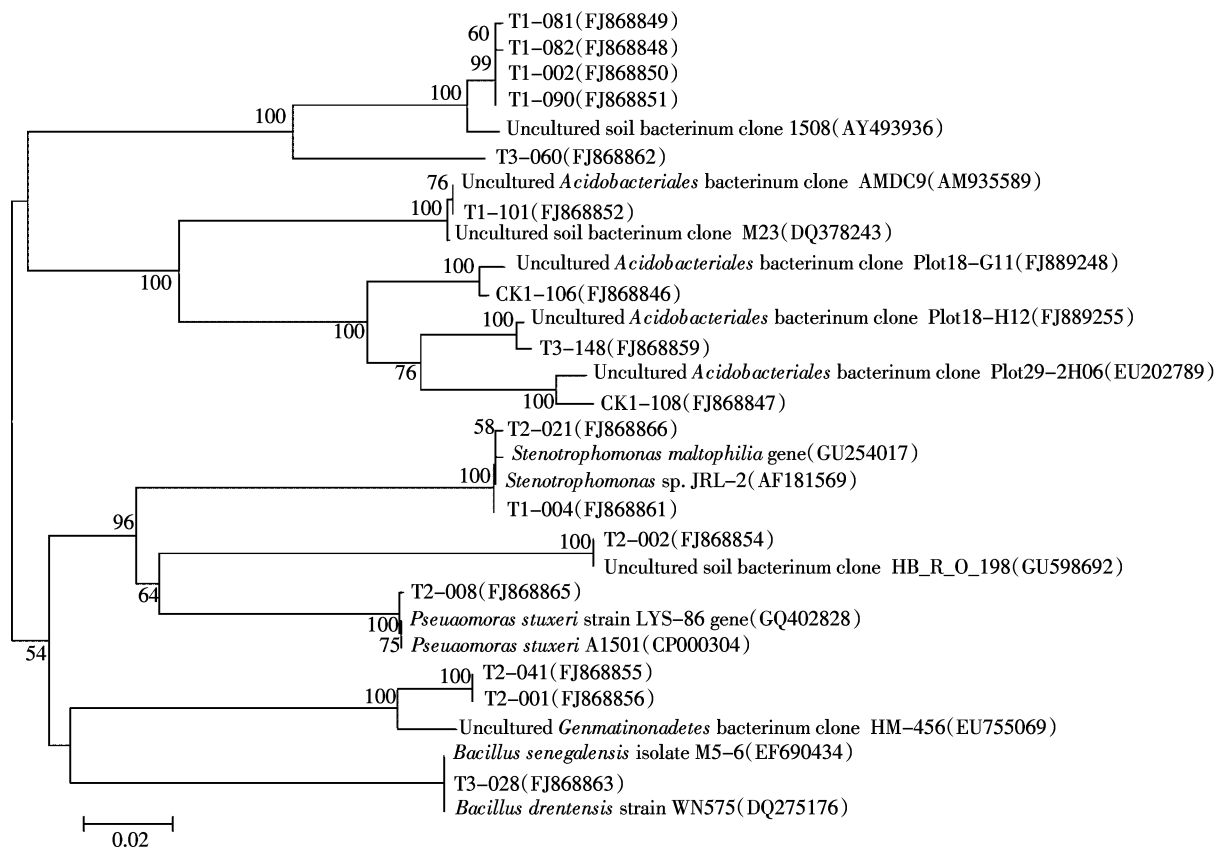


图 4 基于 16S rDNA 构建的部分优势细菌系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree constructed with neighbour-joining methods based on 16S rDNA sequences of partial dominated bacteria in different fertilization treatments. Bootstrap values(>50%) represent nucleotide substitution rate, and the scale bar represents 1% estimated sequence divergence

氮和铵态氮施用的短期作用对供试土壤细菌群落多样性变化。与正常施肥处理相比,过量施用酰胺态氮(T1)和硝态氮(T2)均使细菌的多样性降低,并且产生了不同的优势菌群,前者的优势菌均为未培养土壤细菌^[14],而过量施用硝态氮出现了假单胞菌属(*Pseudomonas* sp)和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp)优势菌。与 T2-008 细菌的相似度达到 99% 的近百个细菌中,绝大多数为假单胞菌属,其中 *Pseudomonas stutzeri* A1501(CP000304.1)菌株具有固氮作用^[15]。铵态氮的过量施用,尽管能够保持细菌多样性,但是也出现了优势细菌。序列比较表明,与优势菌 T3-028 相似度大于 97% 的细菌,其中除了未培养细菌外,均为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp)。王薇等认为好氧反硝化菌中包括芽孢杆菌^[16]。推测 T3-028 为芽孢杆菌,在过量施用铵态氮时,富集成优势种群,参与土壤的反硝化作用。与其他优势菌相比,T3-060 菌株与 NCBI 上已知细菌相似度不高,最高为 89%,但是在大于 87% 相似度中有 14 个为硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)的硝

化螺旋菌属(*Nitrosospira* sp),初步认为该 T3-060 优势菌的功能是参与硝化作用的氨氧化细菌,推测在室内模拟的短期培养条件下,过量施用铵态氮调动了土壤微生物的氨氧化过程,使得亚硝化细菌得到富集成成为最优势菌群,将铵盐转化为硝酸盐。本文的结果表明施肥方式和过量施用不同形态的氮肥会影响土壤微生物的群落结构和多样性的变化。

4 结论

不同形态的氮肥可导致旱地土壤中细菌多样性的变化。合理施肥可显著增加土壤中细菌的多样性,而过量施用酰胺态氮则减少细菌的多样性,使用铵态氮处理可维持细菌多样性。不同处理间土壤细菌的多样性指数(H' 、 D_s)和物种丰富度指数(d_{m})均表现为正常施肥处理>过量施用碳酸氢铵处理>未施肥对照>过量施用硝酸钠处理>过量施用尿素处理。过量施用不同形态的氮肥会影响旱地土壤中细菌的群落结构,导致优势类型改变。部分优势菌的 16S rDNA 序

列比对表明酰胺态氮处理都为未培养细菌;硝态氮处理优势细菌为假单胞菌属、寡养单胞菌属、未培养芽单胞菌属和未培养土壤细菌;铵态氮处理的优势菌为未培养酸杆菌属、寡养单胞菌属和芽孢杆菌属。

参考文献:

- [1] 滕齐辉, 曹 慧, 崔中利, 等. 太湖地区典型菜地土壤微生物 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析[J]. 生物多样性, 2006, 14(4):345-351.
TENG Qi-hui, CAO Hui, CUI Zong-li, et al. PCR-RFLP analysis of bacterial 16S rDNA from a typical garden soil in Taihu region[J]. *Biodiversity Science*, 2006, 14(4):345-351.
- [2] Jon C. Ecology goes underground[J]. *Nature*, 2000, 406(6795):452-454.
- [3] Prosser J I, Bohannan B J M, Curtis T P, et al. The role of ecological theory in microbial ecology[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(5):384-392.
- [4] 李桂花. 不同施肥对土壤微生物活性、群落结构和生物量的影响[J]. 中国农学通报, 2010, 26(14):204-208.
LI Gui-hua. Effect of organic amendments and chemical fertilizer on soil microbial activity, biomass and community structure[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(14):204-208.
- [5] 傅声雷. 土壤生物多样性的研究概况与发展趋势[J]. 生物多样性, 2007, 15(2):109-115.
FU Sheng-lei. A review and perspective on soil biodiversity research[J]. *Biodiversity Science*, 2007, 15(2):109-111.
- [6] 周 桔, 雷 霆. 土壤微生物多样性影响因素及研究方法的现状与展望[J]. 生物多样性, 2007, 15(3):306-311.
ZHOU J, LEI T. Review and prospects on methodology and affecting factors of soil microbial diversity [J]. *Biodiversity Science*, 2007, 15(3):307-311.
- [7] 钟文辉, 蔡祖聪. 土壤管理措施及环境因素对土壤微生物多样性影响研究进展[J]. 生物多样性, 2004, 12(4):456-465.
ZHONG Wen-hui, CAI Zu-cong. Effect of soil management practices and environmental factors on soil microbial diversity: A review[J]. *Biodiversity Science*, 2004, 12(4):456-465.
- [8] 李 杨, 岑 剑, 王保莉, 等. 氮肥缺失对旱地土壤细菌群落多样性的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2009, 27(2):199-203.
LI Yang, CEN Jian, WANG Bao-li, et al. RFLP analysis on the impact of microbial diversity of dry land soils without nitrogenous fertilizer[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2009, 27(2):199-203.
- [9] 王 英, 滕齐辉, 崔中利, 等. 免耕水稻土壤中细菌多样性及其空间分布的研究[J]. 土壤学报, 2007, 44(1):137-143.
WANG Ying, TENG Qi-hui, CUI Zhong-li, et al. Diversity and spatial distribution of bacteria in non-tillage paddy fields[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44(1):137-143.
- [10] Maidak B L, Cole J R, Parker C T, et al. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project)[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(1):171-173.
- [11] 戈 峰. 现代生态学[M]. 北京:科学出版社, 2002:252-254.
GE Feng. Modern ecology[M]. Beijing:Science Press, 2002:252-254.
- [12] 陈宝明. 施氮对植物生长、硝态氮累积及土壤硝态氮残留的影响[J]. 生态环境, 2006, 15(3):630-632.
CHEN Bao-ming. Effect of N supply on plant growth, nitrate accumulation and soil nitrate residue[J]. *Ecology and Environment*, 2006, 15(3):630-632.
- [13] 李 杨, 王保莉, 朱 超, 等. 不同施肥水平下旱地土壤细菌群落多样性的 RFLP 分析[J]. 土壤学报, 2010, 47(2):347-353.
LI Yang, WANG Bao-li, ZHU Chao, et al. RFLP analysis on microbial diversity of dry land soils different in fertilization level[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2010, 47(2):347-353.
- [14] Kim J S, Dungan R S, Crowley D. Microarray analysis of bacterial diversity and distribution in aggregates from a desert agricultural soil[J]. *Biol Fertil Soils*, 2008, 44(8):1003-1011.
- [15] Yan Y, Yang J, Dou Y, et al. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(21):7564-7569.
- [16] 王 薇, 蔡祖聪, 钟文辉, 等. 好氧反硝化菌的研究进展[J]. 应用生态学报, 2007, 18(11):2618-2625.
WANG Wei, CAI Zu-cong, ZHONG Wen-hui, et al. Research advances in aerobic denitrifiers[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(11):2618-2625.