

渭北旱塬长期施肥试验中氨氧化细菌的多样性及群落结构分析

程 林¹, 刘桂婷², 王保莉¹, 曲 东²

(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)

摘 要: 以中国科学院长武黄土高原农业生态试验站 23 a 长期施肥定位试验的土壤样品为研究对象, 通过构建氨氧化细菌的 *amoA* 基因克隆文库, 采用 PCR-RFLP 方法分析了裸地(LD)、种植不施肥(CK)、单施氮肥(N)、单施磷肥(P)和氮磷共施(NP)这 5 个处理条件下土壤中氨氧化细菌的多样性及其群落结构。结果表明, N 处理的土壤中氨氧化细菌的 Shannon-Wiener(H')和 Margalef(d_{M})指数均最高, 其次是 CK、NP、P, 而 LD 处理中最低, 表明长期单施氮肥后增加了土壤中氨氧化细菌的多样性和丰富度, 长期种植作物后也同样会增加土壤中氨氧化细菌的多样性和丰富度, 但单施磷肥和氮磷共施后土壤中氨氧化细菌的多样性和丰富度都有所降低。基于 *amoA* 基因建立的系统进化树显示, 所有来自于各处理条件下土壤中氨氧化细菌的优势种群都是属于 *Nitrosospira* 和 *Nitrosospira*-like, 与 *Nitrosospira* cluster 3 聚为一组, 但优势菌种在克隆文库中所占的比例不同, 表明不同的施肥处理下土壤中氨氧化细菌的群落结构发生了改变。

关键词: 氨氧化细菌; 长期施肥; 多样性; 群落结构

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2010)07-1333-08

Effects of Long-term Fertilization on Diversity and Composition of Ammonia-oxidizing Bacterium Communities in Weibei Dry-land

CHENG Lin¹, LIU Gui-ting², WANG Bao-li¹, QU Dong²

(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)

Abstract: Ammonia-oxidizing microbes play an important role in the biogeochemical cycle of N element and it is also the limited rate of nitrification. The diversity and composition of soil ammonia-oxidizing bacteria were analyzed through constructing its *amoA* gene(*amoA* encodes ammonia monooxygenase) clone library and by PCR-based Restriction Fragment Length Polymorphism analysis(RFLP). The soil sample which had received 23 years continuous fertilization treatments, include fallow(LD), control without fertilizers(CK), nitrogen input(N), phosphorus input(P) and combination of fertilizer nitrogen and phosphorus(NP). They derived from Changwu Agro-ecological Experimental Station on the Loess Plateau, Chinese Academy of Sciences. About 150 positive clones from five different ammonia-oxidizing bacteria libraries were digested by *Rsa* I and *Hha* I, respectively. According to the statistics of diversity index, Shannon-Wiener(H') and Margalef(d_{M}) in the N treatment were the highest, followed by CK, NP and P treatments, and the lowest appeared in the CK. These results demonstrated that the diversity and abundance of soil ammonium-oxidizing bacteria were improved after long-term fertilizers N, but after fertilizers P and combinations of fertilizer N and P, the diversity and abundance of soil ammonium-oxidizing bacteria were both reduced. Phylogenetic tree based on analysis of *amoA* gene sequences showed that the sequences of soil ammonia-oxidizing bacteria affiliated with *Nitrosospira* or *Nitrosospira*-like, and grouped with *Nitrosospira* cluster 3. The proportion of the distribution of sequence types affiliated with *amoA* clusters in the clone libraries were different, which indicated that the composition of soil ammonia-oxidizing bacteria were affected by treatments became changed. Our results also indicated the sequences related to *Nitrosomonas* were predominant in these of five treatments, as well as P was important ef-

收稿日期: 2010-01-06

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: 程 林(1984—), 男, 陕西商洛人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物多样性研究。E-mail: chenglin11111@126.com

通讯作者: 王保莉 E-mail: wbl@nwsuaf.edu.cn

fects of ammonia-oxidizing bacteria diversity and community. These findings could be fundamental to improve our understanding of the importance of ammonia-oxidizing bacteria in the cycling of nitrogen and other nutrients in terrestrial ecosystems.

Keywords: ammonia-oxidizing bacteria; long-term fertilization; diversity; composition

氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria,AOB)是一类能够将氨氧化为亚硝酸盐的细菌,广泛分布于几乎所有土壤、淡水和海洋环境中。氨氧化细菌催化的亚硝化过程为硝化作用的限速步骤,在自然界氮素地球生物化学循环过程中起着重要的作用,因此在微生物生态学中已经建议将其作为一种模式生物^[1]。

可耕种土壤中的氨氧化细菌大多数是好氧型的,属于单一的β-变形菌门,主要包括亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)和亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)两大类^[2]。郝永俊等对更多涉及环境因子(包括铵、酸度、pH、氧气、温度和盐度)对这类好氧氨氧化细菌群落结构和数量的影响研究作了详细综述报道^[3]。袁飞等研究表明,我国潮土、黄泥土和红壤3种不同的土壤中氨氧化细菌种群差异显著,尤其是红壤的氨氧化细菌种群与另外两种土壤差异明显,这种差异可能与红壤的低pH条件对氨氧化细菌种群的长期选择有关^[4]。小麦/蚕豆间作明显改变小麦根际氨氧化细菌群落结构组成,与小麦轮作或间作和与蚕豆间作都改变了玉米根际氨氧化细菌群落结构组成^[5]。张丽娜等分析红壤荒草地富集液中氨氧化细菌的种群组成时发现,在该富集液体系文库中存在大量亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)细菌序列^[6]。莫旭华等对我国华北平原典型旱地小麦土壤中氨氧化细菌群落结构的研究发现 *Nitrosospira* cluster 3 为其主要的优势种群^[7]。

近年来人们对黄土高原地区农业土壤的研究主要集中在长期施肥对土壤中含水量、土壤肥力、农作物产量等的影响^[8]。由于氨氧化细菌的数量和种类对土壤中氮素的转化有着重要的作用,本试验对陕西省长武县长期施肥定位试验的土壤样品进行研究,探讨长期施肥对土壤中氨氧化细菌的多样性和群落结构组成的影响,以揭示长期施肥作用下黄土高原地区农

业土壤中氨氧化细菌的多样性及群落结构特点,为制定合理的施肥制度提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验地的自然条件

研究区位于陕西省长武县(E 107°40',N 35°12'),海拔1 200 m,属于半干旱半湿润性季风气候,年平均气温9.2℃,>10℃积温为3 029℃,年日照时数为2 230 h,日照率为51%,年辐射总量为484 kJ·cm⁻²。研究区为黄土旱塬区,黏壤质黑垆土,1984年秋季布置试验时有机质含量为10.5 g·kg⁻¹,全氮含量为0.57 g·kg⁻¹,碱解氮含量为37.0 mg·kg⁻¹,全磷含量为0.659 g·kg⁻¹,有效磷含量为3.0 mg·kg⁻¹,速效钾含量为129.3 mg·kg⁻¹,pH8.4^[8]。

1.2 试验设计、样品的采集及土壤理化性质

定位试验始于1984年,试验有36个处理,本研究选择其中5个处理,分别为LD(裸地)、CK(种植不施肥)、N(单施N肥)、P(单施P肥)和NP(N、P肥共施)。无机N肥的用量为120 kg·hm⁻²,P肥的用量为60 kg·hm⁻²。氮肥用尿素,磷肥用过磷酸钙。肥料在播种前一次性施入土中,连作冬小麦,田间管理同大田。采样时间为2008年7月份(小麦收获后),土壤样品为5点混合采样,去除表层5 cm土样,采集5~25 cm深度的土样。采样后去除可见的根系,于-80℃冰箱中保存备用。土壤基本的理化性质见表1。

1.3 土壤微生物总DNA提取

土壤微生物总DNA提取参考Zhou等提出的方法并稍做修改^[9]。称取0.300 g土样,加液氮充分研磨后提取,重复10次。将提取的DNA混合,采用0.8%琼脂糖凝胶电泳对其进行纯化,以除去腐植酸等杂质。于70 V电压下电泳30 min,切胶并用胶回收试剂

表1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the soil tested

处理	pH	含水率	有机碳/g·kg ⁻¹	全氮/g·kg ⁻¹	全磷/g·kg ⁻¹	全钾/g·kg ⁻¹	有效磷/mg·kg ⁻¹	速效钾/mg·kg ⁻¹	硝态氮/mg·kg ⁻¹	铵态氮/mg·kg ⁻¹
LD	8.27	16.95%	5.218	0.842 0	21.26	0.301 5	1.348	33.62	7.666	17.67
CK	8.37	16.03%	5.627	0.788 6	20.54	0.193 8	0.311 0	34.83	8.333	18.84
N	8.39	16.38%	6.078	0.801 1	21.90	0.269 9	0.277 0	27.54	11.42	18.27
P	8.35	15.92%	5.741	0.757 6	21.81	0.311 2	6.511	44.96	4.688	17.08
NP	8.35	16.21%	7.047	0.861 5	19.95	0.270 8	2.224	36.05	11.55	17.16

盒回收 DNA。

1.4 *amoA* 基因片段的 PCR 扩增及其克隆文库的构建

上述得到的土壤微生物总 DNA, 使用氨氧化细菌特异的氨单加氧酶 (*amoA*) 引物对 *amoA*-1F 和 *amoA*-2R^[10] 进行 PCR 扩增。扩增体系为: 10×PCR 缓冲液 5 μL , 1 mol·L⁻¹ dNTP 2.5 μL , 引物 (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 1 μL , Taq DNA 聚合酶 (5 U· μL^{-1}) 0.25 μL , DNA 模板 1 μL , ddH₂O 补充体积至 25 μL 。PCR 热循环参数: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 扩增 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳切胶回收。通过 TA 克隆技术将扩增的 *amoA* 基因片段转化到 *E. coli* JM109 中, 蓝白斑筛选后随机选挑取克隆子, 建立 *amoA* 基因的克隆文库, 将克隆文库用 Amp 平板保藏。

1.5 *amoA* 基因的 RFLP 分析

通过菌体 PCR 的方法, 用 pMD 19-T 载体通用 M13 引物重新扩增约 150 个阳性克隆子中插入的 *amoA* 基因片段, 将 PCR 产物分别用 *Hha* I 和 *Rsa* I 两种限制性内切酶消化 (37 $^{\circ}\text{C}$, 4 h)。酶切 DNA 片段用 12% 聚丙烯酰胺凝胶在 100 V 电压下电泳 1.5 h, 银染显色。扫描保存 DNA 带型图谱, 人工比对分析。

每一个基因型称为一个操作分类单元 (OTU) 或称为唯一基因型。

1.6 多样性指数及统计分析方法

通过克隆文库的库容 (*C*) 值、Shannon-Wiener 指数 (*H'*)、Simpson 指数 (*Ds*)、物种丰富度指数 Margalef (*d_M*)、均匀度指数 (*E*) 分析 *amoA* 基因克隆文库的多样性^[11]。聚类分析以细菌分布之间的 Bray-Curtis 相异性测度系数为距离指标, 用非加权平均配对法 (UP-GA) 在 NTsys 2.10 统计软件上进行数据处理^[12]。

1.7 序列测定与系统发育树构建

通过分析 RFLP 分型图谱, 从各处理中大于 3% 的 OTU 中随机挑取 1 个克隆子进行序列测定。序列提交 NCBI 数据库, 构建氨氧化细菌系统发育树。构建软件选取的是 MEGA4.0, 构建方法基于 N-J 法。序列测定由上海生物工程技术服务有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 克隆文库中 *amoA* 基因片段的 RFLP 分析

每个处理随机挑取的阳性克隆子进行菌落 PCR, 纯化后分别用 *Hha* I 和 *Rsa* I 消化, 其部分酶切结果如图 1 和图 2 所示。克隆文库经 *Rsa* I 酶和 *Hha* I 酶

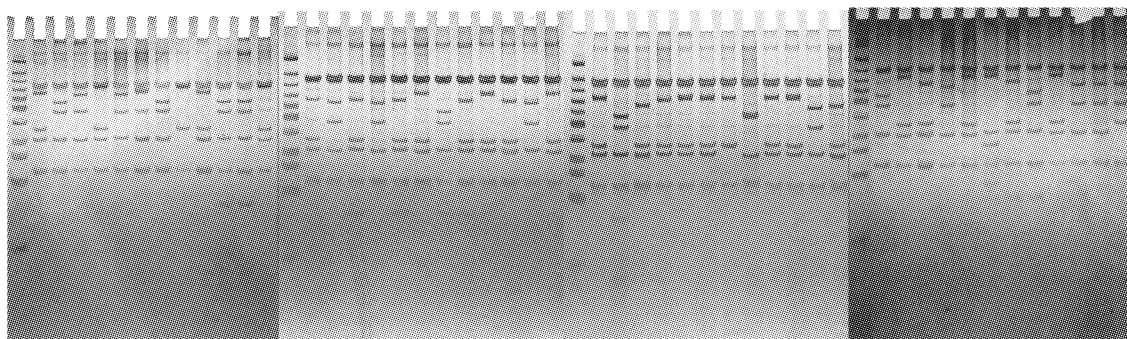


图 1 *amoA* 基因部分克隆子的 *Rsa* I 酶切图谱

Figure 1 Restriction patterns of parts of *amoA* clones, digested by *Rsa* I

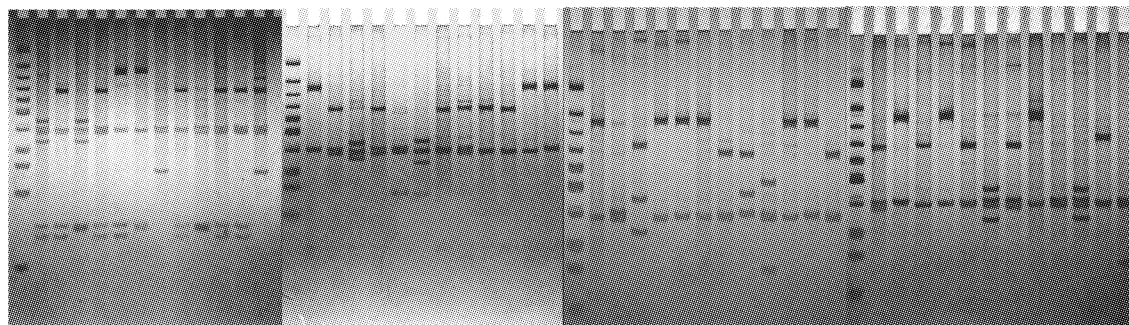


图 2 *amoA* 基因部分克隆子的 *Hha* I 酶切图谱

Figure 2 Restriction patterns of parts of *amoA* clones, digested by *Hha* I

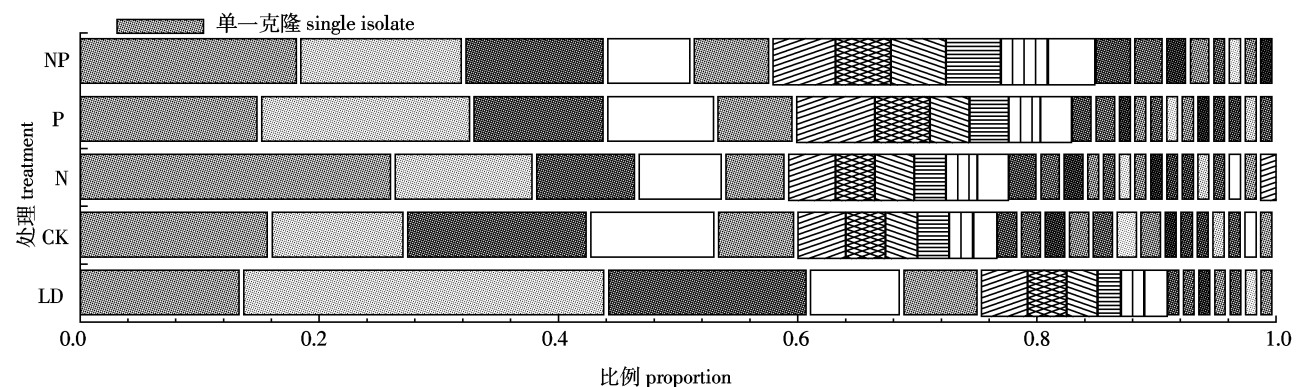


图 3 5 种处理土壤样品 *amoA* 基因的 RFLP 统计结果
Figure 3 Statistic results of RFLP of *amoA* gene in the five treatments

切产生的 RFLP 类型统计结果见图 3。5 种土壤处理中,N 处理的氨氧化细菌产生的酶切类型最多(65 种),其次为 CK(48 种)、NP(46 种)和 P(45 种)处理,LD 最少(38 种)。而出现 1 次的酶切类型,即单一克隆所占比例 N 处理最高,为 26.32%,其次为 NP(18.42%)、CK(16.00%)、LD(13.64%)和 P(15.13%)处理。将各土壤样品>3%以上的 OTU 认为优势菌种,其中 LD 处理优势菌种所占的比例为 30.52%、16.88%、7.79%、6.49%、3.90%、3.25%;CK 优势菌种所占的比例为 15.33%、11.33%、10.67%、6.67%、4.00%和 3.33%;N 处理的优势菌种所占的比例为 11.84%、8.55%、7.24%、5.26%、3.95%、3.29%和 3.29%;P 处理的优势菌种所占的比例为 17.76%、11.18%、9.21%、6.58%、4.61%、3.29%和 3.29%;NP 处理的优势菌种所占的比例为 13.82%、11.84%、7.24%、6.58%、5.26%、4.61%、5.26%、4.61%、4.61%、4.61%、3.95%、3.95%和 3.95%。

2.2 不同处理土壤样品中氨氧化细菌多样性指数比较

将上述试验得到的不同施肥处理土壤样品中氨氧化细菌的 *amoA* 基因的 PCR-RFLP 结果换算为多样性指数,结果见表 2。可以看出,N 处理中氨氧化细菌的多样性 Shannon-Wiener(H')和物种丰富度

Margalef(d_{Ma})指数均最高,其次是 CK、NP、P 处理,LD 处理的 Shannon-Wiener(H')和 Margalef(d_{Ma})指数最低。与对照相比长期单施 N 肥增加了土壤中氨氧化细菌的多样性和丰富度,单施 P 肥和氮磷共施则减少了土壤中氨氧化细菌的多样性和丰富度,说明 P 肥的施用对于土壤中氨氧化菌的多样性和丰富度的影响与氮肥的施用是不同的。与裸地相比,其他处理均增加了土壤中氨氧化细菌的多样性和丰富度,说明种植作物影响了土壤中氨氧化细菌的多样性和丰富度。

2.3 各处理中不同酶切类型的聚类分析

从各个处理中选取大于 3%的 OTU 的 1 个克隆子的酶切图谱,经 Ntsys2.10 聚类软件进行酶切类型聚类分析,结果见图 4。可以看出,各处理之间有聚为一类的,也有单独存在的,表明在不同处理中氨氧化细菌群落结构发生了改变。例如,尽管克隆子 NP-211、LD-141、N-77、P-148 和 CK-563 酶切带型相同,聚为一类,可能是同一种氨氧化细菌,但它们在各自的克隆文库中所占的比例不同,其中 NP-211 所占的比例为 6.58%,LD-141 为 30.52%,N-77 为 8.55%,P-148 为 17.66%,CK-563 为 4.00%;克隆子 LD-68 在 LD 处理的氨氧化细菌的克隆文库中所占的比例为 7.79%,而没有与其他的聚为一类,推测这一类型的氨氧化细菌在裸地土壤中是唯一存在的或在其他处理中出现的概率比较低。

2.4 序列测定与系统发育树的构建

从每个处理中大于 3%的 OTU 中随机挑取 1 个克隆子进行序列测定。使用 N-J 法构建基于氨基酸序列的 *amoA* 系统发育树(图 5)。文中使用的 *Nitrosospora amoA* clusters 系统命名法是根据 Chu 等所定义的^[13],而 Cluster X 是本文的初次定义。各个处理

表 2 克隆文库 PCR-RFLP 的多样性指数						
Table 2 Diversity of PCR-RFLP types of clone libraries						
处理	OTU 种类	库容大小 (C)	多样性指数			
			H'	D_s	d_{Ma}	E
LD	38	86.36%	2.728	0.854 1	7.346	0.541 5
CK	48	80.67%	3.298	0.937 8	9.380	0.658 2
N	65	73.68%	3.704	0.959 6	12.74	0.737 3
P	45	84.87%	3.173	0.929 6	8.758	0.631 5
NP	46	81.57%	3.247	0.940 6	8.957	0.656 3

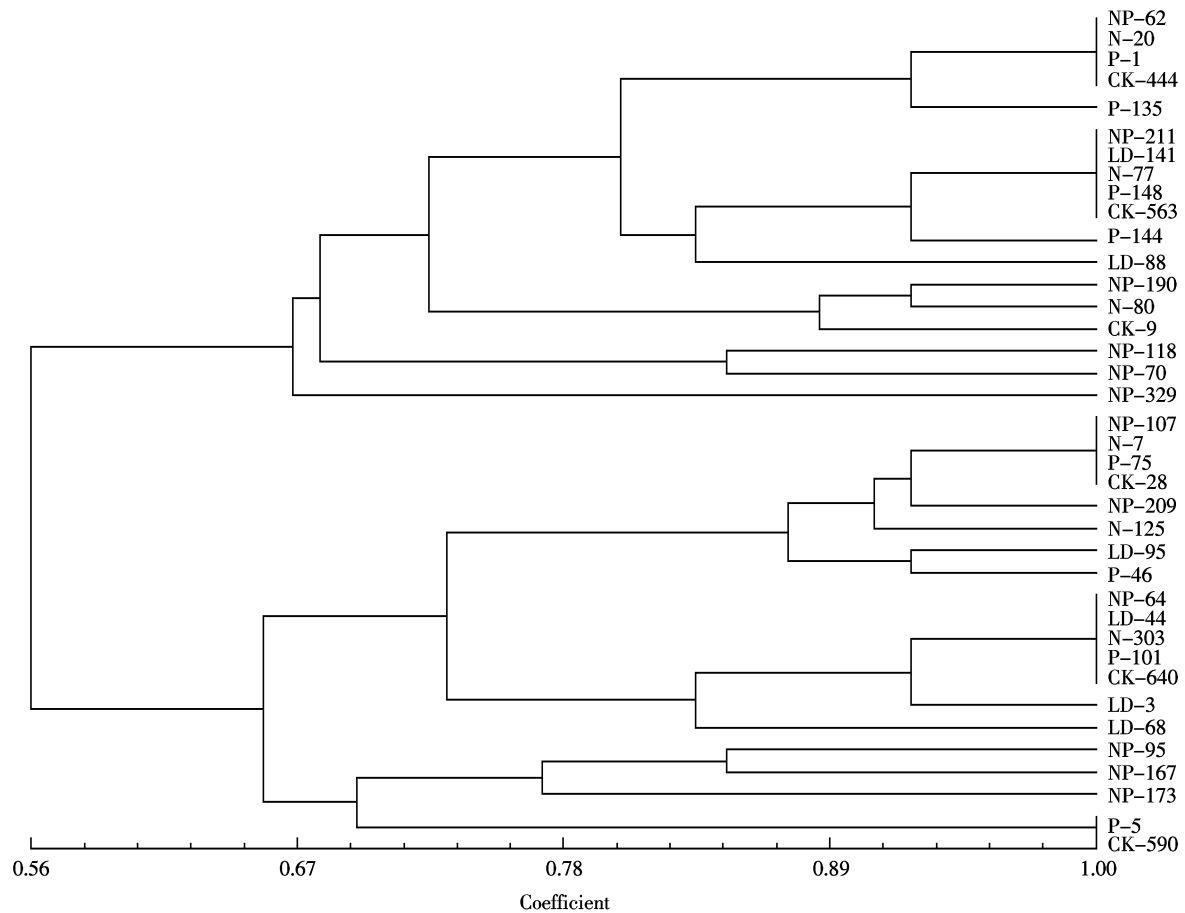


图 4 5 个处理中克隆子不同酶切类型的聚类分析

Figure 4 Clustering analysis of different types of clones enzymed in five treatments

测得的序列都属于 β -变形菌门的 *Nitrosospira*, 没有发现 *Nitrosomonas* 属的存在。绝大部分克隆子的序列都与 *Nitrosospira* cluster 3a 聚为一族, 只有克隆子 NP-190 与 *Nitrosospira* cluster 3b 聚为一族。各处理土壤中只有克隆子 P-46、P-5 和 CK-590 聚为 Cluster X。结果表明, 在长期的施肥处理之后土壤中氨氧化细菌的群落结构发生了改变。

3 讨论

Shannon-Wiener (H') 指数用来衡量微生物群落结构的多样性, 从克隆文库中 OTUs 数目和 OTUs 的相对丰富度计算得来。长期的、不同的施肥形式处理条件下, 土壤中氨氧化细菌群落结构的多样性指数发生了改变 (表 2), 说明不同施肥处理改变了土壤中的氨氧化细菌的多样性。单施氮肥土壤中氨氧化细菌的多样性指数高于对照组, 这可能由于氮肥的施用增加了土壤中铵盐的浓度, 更有利于氨氧化细菌的生长, 进而增加了土壤中氨氧化细菌的多样性, 与之前的相关研究相一致^[13-15]。磷肥和氮磷配施处理下, 土壤中氨

氧化细菌群落结构的多样性指数均低于对照处理, 这可能是由于磷肥的施用增加了作物根际的交换作用和呼吸作用, 造成土壤中有机碳含量的增加 (表 1), 导致其他微生物种类的增加^[16], 使得土壤中氨氧化细菌的多样性下降。

Enwall 等使用 DGGE 技术研究表明, 长期施用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 后种植玉米的酸性土壤中氨氧化细菌的群落结构发生了明显的改变^[17]。在酸性的牧草土壤中, Webster 等发现长期施用 NH_4NO_3 也改变了土壤中氨氧化细菌群落结构^[18]。本文通过各处理不同酶切类型的聚类分析发现, 尽管各个处理之间存在相同的酶切类型的克隆子, 但其在各自的克隆文库中所占比例不同, 表明长期的施肥处理下土壤中氨氧化细菌的群落结构也发生了改变。

本文供试土样中只发现 *Nitrosospira* 菌属存在而没有发现 *Nitrosomonas* 菌属的存在, 这与此前的许多研究相一致。氮肥的施用刺激了 *Nitrosospira* cluster 3 的生长, 导致其成为土壤中的优势菌属^[13]。Kowalchuk 等研究表明, 在相对较高的铵浓度下氨氧化细菌 *Ni-*

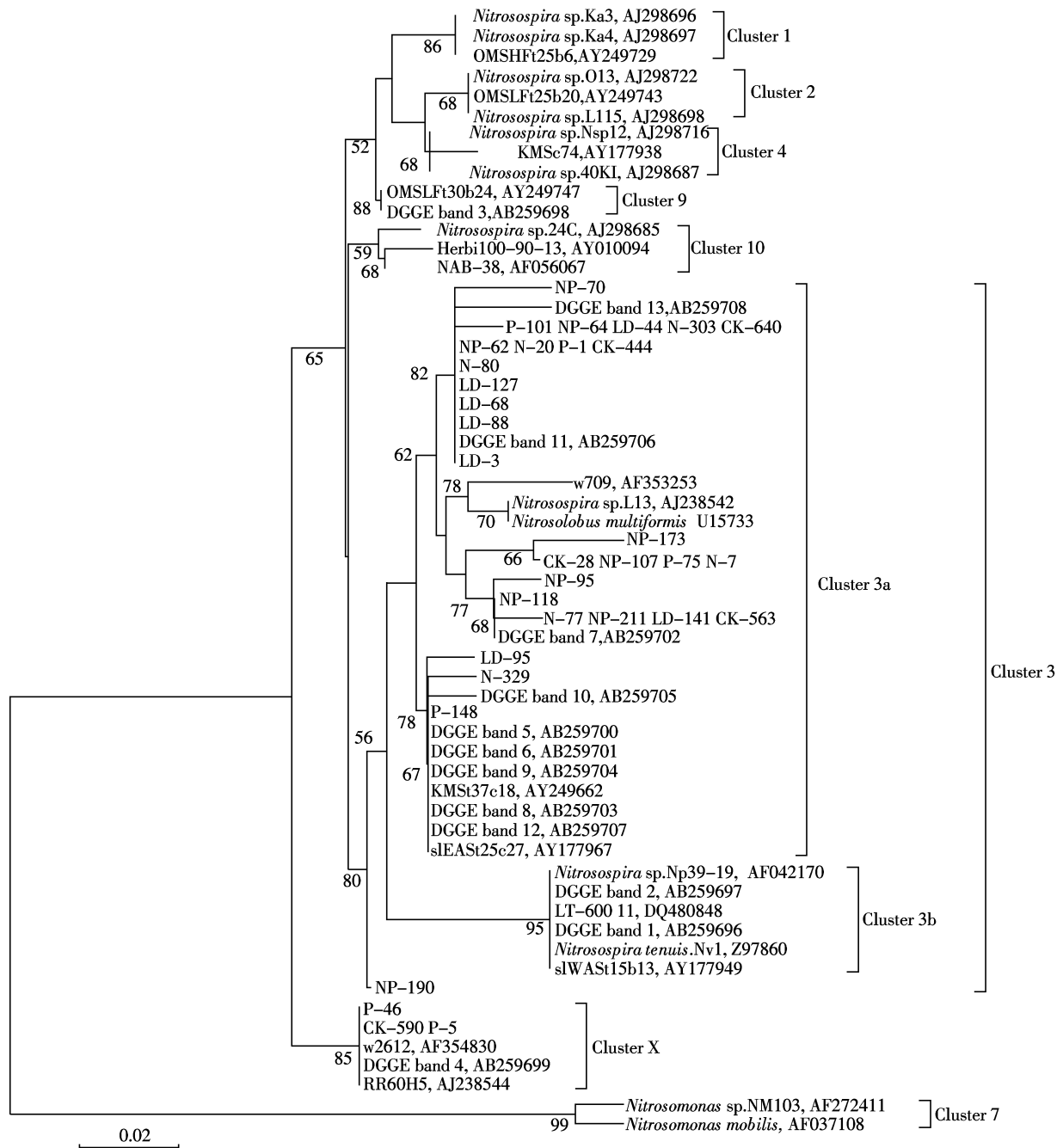


图 5 基于 *amoA* 部分氨基酸序列(163 个氨基酸)建立的氨氧化细菌的系统进化树(Neighbor-Joining tree)

Figure 5 Phylogenetic tree of ammonium-oxidising bacteria based on partial amino acid(163 amino acids) sequence of *amoA*

Nitrosospira cluster 3 成为优势菌属^[19]。Belse 等也认为在高铵浓度的培养条件下 *Nitrosospira* cluster 3 能够更好的生长^[20]。但是, Avrahami 等指出 *Nitrosospira* cluster 3 不一定在较高铵浓度的条件下才能成为优势菌属^[21], Chu 等发现在不施肥对照处理中 *Nitrosospira* cluster 3 也是优势菌属^[13]。在本文研究中, *Nitrosospira* cluster 3 不仅在施用氮肥的处理中是优势菌属, 在裸地、对照和单施磷肥处理的土壤中也同样是优势菌属。

此前已有研究表明, *Nitrosospira* cluster 3a 和 *Nitrosospira* cluster 3b 对于铵浓度的需求表现出不同的趋向性^[21]。Chu 等在研究长期施肥处理下土壤中氨氧化细菌时也发现施用氮肥的处理中所得到的大部分序列都与 *Nitrosospira* cluster 3a 聚为一族^[13], 这与本试验结果相一致。

在本文供试土样中没有发现 *Nitrosospira* cluster 2 和 *Nitrosospira* cluster 4 存在。虽然在酸性土壤中比

较常见 *Nitrospira* cluster 2^[20,22],但贺纪正等在研究长期定位试验点红壤(pH3.7~5.8)并没有发现 *Nitrospira* cluster 2 菌属的存在^[15],推测 *Nitrospira* cluster 2 偏爱于在 pH 值比较低的土壤环境条件中生存。本文供试土样的 pH 值为 8.27~8.35(表 1),这可能是未能发现 *Nitrospira* cluster 2 存在的原因,此前在对碱性沙壤未施肥土壤研究中发现存在 *Nitrospira* cluster 9^[13-14]。贺纪正等在河南封丘长期定位试验点碱性潮土的研究中没有发现 *Nitrospira* cluster 9 存在^[14],本试验土壤中也未发现 *Nitrospira* cluster 9 的存在,这可能是由于 *Nitrospira* cluster 9 的丰富度不高而造成的。

4 结论

(1)种植作物的不施肥对照土壤中氨氧化细菌的多样性高于裸地,长期单施氮肥后增加了土壤中氨氧化细菌的多样性和丰富度,长期单施磷肥和氮磷共施土壤中氨氧化细菌的多样性和丰富度均有所减少。

(2)本试验 5 个处理的土壤中,均以氨氧化细菌 *Nitrospira* cluster 3 为优势种群。

(3)长期单施氮肥、磷肥和氮磷共施的处理中氨氧化细菌的群落结构均发生了不同程度的改变。

参考文献:

- [1] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55: 485-529.
- [2] Stephen J R, McCaig A E, Smith Z, et al. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to β -subgroup ammonia-oxidizing bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (11): 4147-4154.
- [3] 郝永俊, 吴松维, 吴伟祥, 等. 好氧氨氧化菌的种群生态学研究进展[J]. *生态学报*, 2007, 27(4): 1573-1582.
HAO Yong-jun, WU Song-wei, WU Wei-xiang, et al. Research progress on the microbial ecology of aerobic ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(4): 1573-1582.
- [4] 袁飞, 冉炜, 胡江, 等. 变性梯度凝胶电泳法研究我国不同土壤氨氧化细菌群落组成及活性[J]. *生态学报*, 2005, 25(6): 1318-1324.
YUAN Fei, RAN Wei, HU Jiang, et al. Ammonia-oxidizing bacteria communities and their influence on the nitrification potential of Chinese soils measured by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(6): 1318-1324.
- [5] 宋亚娜, 李隆, 包兴国, 等. 应用 DGGE 技术研究间、轮作对根际氨氧化细菌和固氮菌群落结构的影响[J]. *江西农业大学学报*, 2006, 28(4): 506-511.
SONG Ya-na, LI Long, BAO Xing-guo, et al. A study of rhizosphere ammonia-oxidizer and N_2 -fixer community composition in different cropping systems by DGGE[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2006, 28(4): 506-511.
- [6] 张丽娜, 曹慧, 崔中利, 等. 红壤荒地氨氧化细菌富集液 16S rDNA 文库的 RFLP 分析[J]. *土壤学报*, 2006, 43(4): 635-640.
ZHANG Li-na, CAO hui, CUI Zhong-li, et al. RFLP analysis of AOB-specific 16S rDNA library from red soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(4): 635-640.
- [7] 莫旭华, 史荣久, 李慧, 等. 华北典型旱地小麦土 amoA 基因的 PCR-RFLP 分析[J]. *生态科学*, 2009, 28(1): 49-55.
MO Xu-hua, SHI Rong-jiu, LI Hui, et al. PCR-RFLP analysis of amoA gene in wheat soil of North China[J]. *Ecological Science*, 2009, 28(1): 49-55.
- [8] 赵云英, 谢永生, 郝明德. 黄土旱塬小麦长期施肥的产量效应及土壤肥力变化[J]. *西北农业学报*, 2007, 16(5): 75-79.
ZHAO Yun-ying, XIE Yong-sheng, HAO Ming-de. Yield effects and soil fertility evolution of long-term application of fertilizer on wheat in dry land of loess plateau [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2007, 16(5): 75-79.
- [9] Zhu J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soil of diverse composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316-322.
- [10] Rothauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4704-4712.
- [11] 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 zhong-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.
- [12] 夏北成, 周 J, Tiedje J M. 土壤细菌类克隆群落及其结构的生态学特征[J]. *生态学报*, 2001, 21(4): 574-578.
XIA Bei-cheng, Zhou J, Tiedje J M. Structures of bacteria cloning communities in the soil environment and their ecological characteristics[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(4): 574-578.
- [13] Chu H Y, Fujii T, Morimoto S E, 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.
- [14] 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(11): 1601-1611.
- [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 up land red soil under long-term fertilization practices[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9): 2364-2374.
- [16] Zhong W H, Cai Z C. Long-term effects of inorganic fertilizers on microbial biomass and community functional diversity in a paddy soil de-

- rived from quaternary red clay[J]. *Applied Soil Ecology*, 2007, 36(2-3): 84-91.
- [17] Enwall K, Nyberg K, Bertilsson S, et al. Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(1): 106-115.
- [18] Webster G, Embley M, Prosser J I. Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of β -Proteobacterial ammonia oxidizer populations [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(1): 20-30.
- [19] Kowalchuk G A, Stienstra A W, Heilig G H, et al. Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands[J]. *Environmental Microbiology*, 2000, 2(1): 99-110.
- [20] Belser L W, Schmidt E L. Diversity in the ammonia-oxidizing population of a soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, 36(4): 584-588.
- [21] Avrahami S, Liesack W, Conrad R. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(8): 691-705.
- [22] Stephen J R, Kowalchuk G A, Bruns M A V, et al. Analysis of β -subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(8): 2958-2965.