

施肥对设施菜地氨氧化细菌群落和丰度的影响

王亚男¹, 曾希柏^{1*}, 俄胜哲², 白玲玉¹, 李莲芳¹, 苏世鸣¹, 沈灵凤¹

(1.中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所 农业部农业环境重点实验室, 北京 100081; 2.甘肃省农业科学院土壤肥料与节水农业研究所, 兰州 730070)

摘要:以甘肃武威设施菜地为对象,采用 *amoA* 基因末端限制性片段多态性分析(PCR-TRFLP)技术与实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)相结合的方法,研究了不同施肥处理下土壤中氨氧化细菌群落组成和丰度的变化。结果表明:设施菜地中氨氧化细菌的优势种群均为 *Nitrosospira* cluster 3 属,亦含有少量 *Nitrosomanas* cluster 7 属。定量 PCR 分析发现在当地农民习惯施肥用量一半的处理下(1/2 MNPK),0~20 cm 和 20~40 cm 土层中氨氧化细菌的丰度最大值分别为每克干土 9.95×10^7 、 6.65×10^7 拷贝数,比不施肥处理增加了 105.0%和 315.3%。施肥类型、土壤层次均是导致氨氧化细菌群落结构和丰度变化的重要因素。研究结果对进一步探讨设施栽培条件下氨氧化细菌的功能、环境适应机理及其在土壤氮素循环中的作用等,均具有较大的参考意义。

关键词:氨氧化细菌;施肥;群落结构;T-RFLP;实时荧光定量 PCR

中图分类号:S154.36 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)12-2425-08

Effects of Fertilization Treatments on Community Structure and Abundance of Ammonia-oxidizing Bacteria in Greenhouse Soil

WANG Ya-nan¹, ZENG Xi-bai^{1*}, E Sheng-zhe², BAI Ling-yu¹, LI Lian-fang¹, SU Shi-ming¹, SHEN Ling-feng¹

(1.Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture of P.R.China, Beijing 100081, China; 2.Institute of Soil, Fertilizer and Water-saving in Agriculture, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The effects of five fertilization treatments on the community structure and abundance of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) were determined by the combination of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and real-time quantitative PCR in the greenhouse soils in Wuwei City of Gansu Province. The results by cloning and sequencing of *amoA* gene fragments showed that the AOB community in soils for all treatments consisted of two major groups, i.e. *Nitrosospira* cluster 3 and *Nitrosomanas* cluster 7. The sequences related to *Nitrosospira* cluster 3 were predominant. The highest abundance of the AOB both in 0~20 cm and 20~40 cm soil layers were detected in the fertilization treatment which is the half of the farmer's conventional amount (1/2MNPK), while the *amoA* gene copy number was with 9.95×10^7 and 6.65×10^7 copies $\cdot g^{-1}$ soil respectively, which was 105.0% and 315.3% higher respectively in 0~20 cm and 20~40 cm soil layers for 1/2MNPK treatment than that in the unfertilized treatment. Both fertilizer types and soil layers were the important factors that deduced the changes of AOB community and abundance. The results had significant references to the further exploring characteristic and adaptation mechanism of AOB in the soil nitrogen cycle under facility cultivation conditions.

Keywords: ammonia-oxidizing bacteria; fertilization; community structure; terminal restriction fragment length polymorphism; real-time fluorescent quantitative PCR

收稿日期:2012-07-23

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划 2012BAD05B06;公益性科研院所(中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所)专项资金

作者简介:王亚男(1983—),女,山东德州人,博士研究生,助研,主要从事土壤生态与修复和微生物分子生态研究。E-mail:wangyn@ieda.org.cn

* 通信作者:曾希柏 E-mail:zengxb@ieda.org.cn

氨氧化细菌广泛分布于土壤、淡水和海洋环境中,在自然界氮素生物地球化学循环中起着重要作用,是硝化过程必不可少、也是决定其进程的关键微生物,并被作为微生物生态学研究的模式生物^[1-2]。一般认为耕地中氨氧化细菌主要为好氧型,属单一的β-变形菌门,包括亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)和亚硝化单胞菌属(*Nitrosomanas*)两大类^[3-4]。所有的氨氧化细菌都含有编码催化氨氧化第一步反应的氨单加氧酶 *amoA*, *amoA* 基因在氨氧化细菌中普遍存在且可作为氨氧化细菌特异的分子标记^[5]。1997 年, Rotthauwe^[6] 使用 *amoA*-PCR 方法研究了自养氨氧化细菌群落的结构。此后, *amoA* 基因被广泛用于各种生态型自养氨氧化细菌群落结构的研究^[6-7]。Chu 等^[8]和辜运富等^[9]运用 PCR-DGGE 方法研究了长期不同施肥对土壤氨氧化细菌群落结构的影响,基于实时荧光 PCR 的定量研究结果显示,施肥处理下土壤中氨氧化细菌的数量是不施肥的 3 倍多^[10],且随氮素施用量的增加而增加^[11]。Horz 等^[12]研究发现氨氧化细菌的群落结构和丰度会随温度、CO₂ 浓度、降水量和氮肥施用量等环境条件的变化而变化,且土壤 pH 值对亚硝化螺菌属的群落结构和氨氧化能力有重要影响^[13]。贺纪正等^[13-15]对农田生态系统中氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)丰度、组成及其与环境的相互关系进行了一系列研究,发现碱性土壤中(pH 8.3~8.7)不同施肥处理对 AOB 数量及其群落结构影响明显,而对 AOA 的影响较小;在酸性土壤中(pH 3.7~5.8)AOA 的群落结构和组成受施肥及土壤性质的影响比 AOB 更明显。Wang 等^[16]的研究结果也认为,在北方偏碱性水稻土中施氮量可以引起氨氧化细菌群落种属之间的变化,但在 DGGE 条带上发现氨氧化古菌群落结构没有明显差异,这意味着在偏碱性土壤中氨氧化作用的变化可能主要受 AOB 群落变化的影响,而 AOA 在海洋氮循环中发挥的作用更为显著。

农业管理方式对土壤中氨氧化细菌群落结构和活性具有重要影响^[14],近年来的研究多集中在大田土壤,对设施条件下氨氧化细菌数量及群落结构变化的系统研究较少。本文以课题组在甘肃武威的长期定位试验为基础,采用 PCR-TRFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, 末端限制性片段多态性分析)和实时荧光定量 PCR(Real-time Fluorescent quantitative PCR)的方法,系统探讨设施栽培条件下不同施肥对氨氧化细菌群落组成和丰度的影响,为进一步研究设施栽培条件下参与氮素循环重要微生物

的数量及其适应机制等提供科学基础,并为设施菜地合理施肥提供指导。

1 材料与方法

1.1 试验设计及土壤采集

试验始于 2007 年,地点位于甘肃省武威市高坝镇(北纬 37°53', 东经 102°40'),海拔 1632 m,属于大陆干旱型气候。土壤为灌漠土,试验前耕层土壤(0~20 cm)的基本性质为:pH 8.65,有机质 12.4 g·kg⁻¹,全氮 0.83 g·kg⁻¹,全磷 0.75 g·kg⁻¹,全钾 20.9 g·kg⁻¹,碱解氮 41 mg·kg⁻¹,硝态氮 5.02 mg·kg⁻¹,速效磷 9.6 mg·kg⁻¹,速效钾 89 mg·kg⁻¹,阳离子交换量(CEC) 8.36 cmol (+)·kg⁻¹。20~40 cm 层土壤的基本性质为:pH8.72,有机质 13.1 g·kg⁻¹,全氮 0.86 g·kg⁻¹,全磷 0.78 g·kg⁻¹,全钾 21.2 g·kg⁻¹,碱解氮 42 mg·kg⁻¹,硝态氮 3.03 mg·kg⁻¹,速效磷 14.9 mg·kg⁻¹,速效钾 102 mg·kg⁻¹,阳离子交换量(CEC)8.52 cmol(+)·kg⁻¹。

试验共设置 5 个处理,分别为:①对照(CK),不施任何肥料;②常规施肥(MNPK),即按当地农民习惯施肥,其中的化肥氮和有机肥氮比例为 7.24:10,有机肥为猪粪、牛粪;③1/2 常规施肥(1/2 MNPK),按常规施肥处理氮、磷、钾和有机肥施用量的一半施肥,有机肥为猪粪、牛粪,化肥氮和有机肥氮比例仍为 7.24:10;④全有机肥(M),按 1/2 MNPK 等氮量折算施用有机肥,有机肥为猪粪、牛粪,不足磷钾养分用化肥补充;⑤全化肥(NPK),按 1/2 MNPK 等养分量施用氮磷钾化肥。各处理施肥量如表 1。

表 1 试验处理设计及施肥量
Table 1 Fertilizer amount in each district with different treatments

处理代号 Code	N/kg·hm ⁻²	P ₂ O ₅ /kg·hm ⁻²	K ₂ O/kg·hm ⁻²
CK	0	0	0
1/2 MNPK	740	750	560
MNPK	1480	1500	1120
M	740	750	560

试验重复 3 次,随机区组设计,小区面积为 3.6 m×7.5 m=27 m²。基肥每年施用 1 次,追肥在两茬蔬菜坐果前至采收期间分 11 次从垄沟随水施入。试验期间的田间管理按当地农民习惯进行,每年种植两茬蔬菜,黄瓜和西红柿轮作。

在小区试验第三年时(2010 年 7 月 8 日),按蛇形布点法、每个小区采 5 点分处理采集 0~20 cm、20~40 cm 土层土壤样品,将其混合均匀并用四分法留取约 1 kg,分成两份分别装入聚乙烯袋中密封。其中,用

于微生物分析的部分过 2 mm 尼龙筛后立即放入冰盒,带回实验室置于-80 ℃冰箱保存;用于理化性质测定的样品置于室内自然风干、研磨、过筛后备用。不同处理下土壤的理化性质如表 2 所示。

1.2 土壤氨氧化细菌群落结构分析

1.2.1 土壤微生物 DNA 的提取

土壤微生物总 DNA 的提取方法和步骤按照 Fast DNA SPIN(BIO 101)土壤 DNA 提取试剂盒的说明进行。将 500 mg 过 2 mm 筛的新鲜土壤样品装入试剂盒的 Lysing Matrix E 管中,加入细胞壁溶解液和缓冲溶液,将小管放入 FastPrep 仪器中,利用玻璃珠的快速振动将细胞壁打碎使得 DNA 游离出来。再通过溶液提取、与 Banding Mitrix 结合、SEWS-M 清洗等过程,最后用 100 μL DES 洗脱液进行洗脱分离。将提取的 DNA 进一步采用 Ultra Clean DNA 纯化试剂盒(MO BIO Labs,Solana Beach,CA)进行纯化去除干扰杂质,最终分装后保存于-20 ℃冰箱中。

1.2.2 氨氧化细菌 *amoA* 基因的 PCR 扩增及 T-RFLP 分析

在对土壤中氨氧化细菌进行 T-RFLP 分析时,首先将一条引物的一端加上荧光标记,这样能保证酶切后能检测到带有荧光标记的信号。前引物一般选取所得氨氧化细菌特有功能基因 *amoA* 的引物 *amoA*-1F(5'-GGG GTT TCT ACT GGT GGT-3',TaKaRa)并在 5'端加上 6-FAM 的荧光标记,后引物为 *amoA*-2R(5'-CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC-3'[K=G 或 T;S=G 或 C])^[17](TaKaRa)。

50 μL 的 PCR 反应体系包括:1×PCR 缓冲液(TaKaRa),1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂(TaKaRa),200 μmol·L⁻¹ dNTP(TaKaRa),各引物 0.5 μmol·L⁻¹(TaKaRa),0.25U

的 DNA Taq 酶(TaKaRa),模板 1 μL,用灭菌超纯水补足至总体积为 50 μL。PCR 的反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,57 ℃ 45 s,72 ℃ 60 s,28 个循环;72 ℃ 延伸 6 min。PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测并用生工纯化试剂盒纯化,-20 ℃保存备用。

纯化后氨氧化细菌 *amoA* 基因的 PCR 产物用限制性内切酶 *Msp* I(Fermentas International Inc.)进行酶切。反应体系为:10×Tango buffer 2 μL,*Msp* I 10U,PCR 纯化产物 10 μL,加灭菌超纯水补足至总体积为 20 μL。混匀后 37 ℃酶切 3~6 h,65 ℃失活 20 min。

1.2.3 酶切产物的纯化和检测

酶切产物用乙醇沉淀法纯化,即在酶切产物中加入 1/10 体积的 3 mol·L⁻¹ 醋酸钠(pH5.7)和两倍体积的无水乙醇,混匀后-20 ℃过夜,离心 15 min(20 000 g,4 ℃)后,弃去上清液,在残留物中加入 70 μL 70%的冰乙醇,离心 8 min(20 000 g,4 ℃),弃去上清液,将残留物在通风橱中风干 10 min,于-20 ℃保存。进行 T-RFLP 分析时,根据纯化后 PCR 产物的浓度确定最终加入 10 μL 水。将 1~2 μL 上述纯化产物加入去离子甲酰胺和内标的混合物中。混合液在 95 ℃变性 3 min 后立即置于冰上冷却。消化产物在 3130 测序仪(ABI)上进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,用自动测序仪检测,末端带荧光标记的片段能被自动检测到,然后根据峰高计算不同片段的相对丰度。

1.2.4 克隆及测序分析

进行基因克隆 PCR 扩增时,选用不带荧光标记的前后引物,将 PCR 产物进行切胶回收纯化。纯化产物采用 pMD19-T Vector (TaKaRa)连接后,转化到 JM109 感受态细胞(TaKaRa)中,涂在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 LB 琼脂平板培养基上,37 ℃过夜培

表 2 不同处理第三年时土壤的理化性质
Table 2 The physical and chemical properties of soils in different fertilization treatments in the third year

土层 Soil layers	处理 Fertilization treatments	pH	有机质/g·kg ⁻¹ Organic matter	硝态氮/mg·kg ⁻¹ Nitrate-N	全磷/g·kg ⁻¹ Total-P	全钾/mg·g ⁻¹ Total-K
0~20 cm	CK	8.78	12.46	4.27	0.71	22.95
	1/2MNPK	8.24	16.32	50.88	1.04	23.10
	MNPK	8.18	21.36	33.02	1.25	24.01
	M	8.46	19.21	23.57	0.99	22.64
	NPK	8.48	12.96	8.35	0.99	22.82
20~40 cm	CK	8.80	12.92	2.56	0.71	23.04
	1/2MNPK	8.34	16.19	36.74	1.02	23.20
	MNPK	8.26	19.44	26.50	1.16	24.06
	M	8.54	15.09	18.87	0.91	23.16
	NPK	8.44	12.46	18.90	0.93	23.16

养,使其形成单菌落。挑选白色克隆至 LB-Amp 平板上划线,37℃过夜培养。检测白色菌落是否为阳性克隆,引物为 M13-47(5'-CAG CAC TGA CCC TTT TGG GAC CGC-3')和 RV-M(5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3'),将阳性克隆送博迈德公司测序分析。

将测序所得序列在 NCBI 的 GenBank 数据库中进行 Blast 对比,获取相近的基因序列。再利用 CHECK-CHIMERA 软件分析检查去除嵌合及怪异序列。将测序的序列和部分网上下载的 *amoA* 基因相似序列,利用 Clustal X 和 Mega 5.0 软件分析多重比对结果,采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树。将 *amoA* 基因序列提交 EMBL 核苷酸数据库,获得系列号 FR751343-FR751394。

1.2.5 氨氧化细菌的定量 PCR

用测序阳性克隆质粒配制 *amoA* 功能基因定量 PCR 标准曲线。细菌 *amoA* 基因定量 PCR 引物仍然为 *amoA*-1F 和 *amoA*-2R。采用荧光定量方法,用伯乐 IQ5 定量 PCR 专用试剂,加 2 μL 20 倍稀释的 DNA 模板,用灭菌高纯水补足至 25 μL。反应程序为:95℃变性 4 min;然后 95℃变性 30 s,57℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,82℃收集荧光信号 30 s,共 40 个循环;95℃1 min,55℃1 min;最后做溶解曲线,从 55℃开始以每个循环 10 s,0.2℃递增,至 95℃结束。

1.2.6 数据处理

使用 CANOCO for Windows 4.5 软件(Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA) 分析氨氧化细菌 *amoA* 基因的 T-RFs 长度、丰度与土壤理化性质的关系,使用 SPSS16.0 软件(SPSS 16.0 for windows, SPSS Inc, Chicago, USA)进行方差分析和相关性分析。

2 结果与分析

2.1 氨氧化细菌的 T-RFLP 分析

将土壤样品的 *amoA* 功能基因用 *Msp* I 内切酶酶切后,得到 4 个主要片段长度,分别是 60 bp、156 bp、235 bp 和 256 bp。对主要片段进行分析后得到图 1。可以看出,不同施肥对 0~20 cm 和 20~40 cm 土层中 156 bp 和 256 bp 两个片段百分比变化的影响较小。156 bp 在各个样品中平均约占 5%,最大不超过 9%;256 bp 在各个样品中平均约占 10%,最大不超过 17%。但是,不同处理间 TRFs 的主要片段 60 bp 和 235 bp 则有较明显差异,其中 235 bp 片段所占比例较高,最大达到 62%。同一土层中,235 bp 片段一般

以 CK 和 NPK 处理较高。不同土层比较,0~20 cm 土层中 60 bp 片段以 M 处理最高,235 bp 则以 NPK 处理最高;20~40 cm 土层中 60 bp 片段以 MNPK 处理最高,235 bp 则以 CK 处理最高。

对相关结果进行统计分析(表 3)可以看出,施肥对 60 bp、235 bp 和 256 bp 片段的百分比都有显著影响,而土壤层次则主要影响 60 bp 和 235 bp 两个片段。不同施肥处理间片段百分比的变化幅度明显要大于土层间的变幅。说明在设施栽培条件下,土壤中氨氧化细菌的状况受施肥的影响更大。

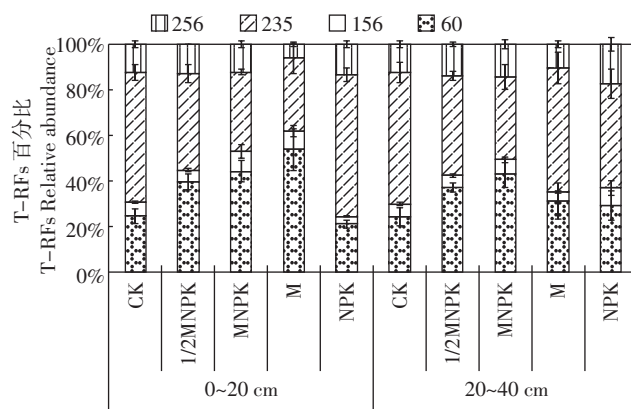


图 1 不同处理氨氧化细菌 *amoA* 的 T-RFs 片段百分比
(平均值±标准偏差, $n=3$)

Figure 1 Relative abundance of bacteria *amoA* T-RFs in different fertilization treatments (Data are presented as mean±SE, $n=3$)

表 3 MANOVA 分析不同处理对 *amoA* 基因
T-RFs 片段影响的显著性

Table 3 MANOVA analysis of the relative abundance of
amoA TRFs

片段长度	60 bp	156 bp	235 bp	256 bp
A	<0.001	0.284	<0.001	0.030
B	0.049	0.482	0.013	0.943

注:A:处理间比较;B:土层间比较; $P<0.05$ 表示有显著影响。

Note: A, Fertilization treatments; B, Soil layers; $P<0.05$ Significant effects.

2.2 土壤氨氧化细菌的系统发育树

在本研究中,挑选氨氧化细菌片段较丰富的样品(MNPK 第二个重复的 0~20 cm 土层样品)进行克隆文库构建。选取 52 个阳性克隆子进行测序分析,将克隆测序的结果与典型氨氧化细菌进行比对,构建系统发育树(图 2)。

图 2 所示的测序结果显示,本试验所处条件下土壤中氨氧化细菌的所有序列均属于 β -变形菌门,主要包括 *Nitrosospora* cluster 3a、*Nitrosospora* cluster 3b 和

Nitrosomanas cluster 7 三个属。其中属于 *Nitrosospira* cluster 3a 的片段包括 60 bp、235 bp 和 256 bp, 属于 *Nitrosospira* cluster 3b 的片段包括 60 bp 和 156 bp, 还有一部分 60 bp 的片段属于 *Nitrosomanas* cluster 7。235 bp 和 256 bp 为 *Nitrosospira* cluster 3a 氨氧化细菌特有, 156 bp 为 *Nitrosospira* cluster 3b 氨氧化细菌特有, 而 60 bp 片段则分布在 3 个 cluster 中。 *Nitrosospira* cluster 3a 和 *Nitrosospira* cluster 3b 这两个属

的氨氧化细菌的序列由于都属于 *Nitrosospira* cluster 3, 其相似度高, 很难通过酶切分型将其完全区别。为进一步将属于 *Nitrosospira* 和 *Nitrosomanas* 这两个属的氨氧化细菌分开, 选用 *Bsa* I 酶对测得的序列作进一步分析。发现属于 *Nitrosomanas* cluster 7 的氨氧化细菌用 *Bsa* I 酶酶切后, 酶切片段长度为 319 bp, 而属于 *Nitrosospira* cluster 3a 和 *Nitrosospira* cluster 3b 的氨氧化细菌酶切后得到的主要片段长度为 60 bp、

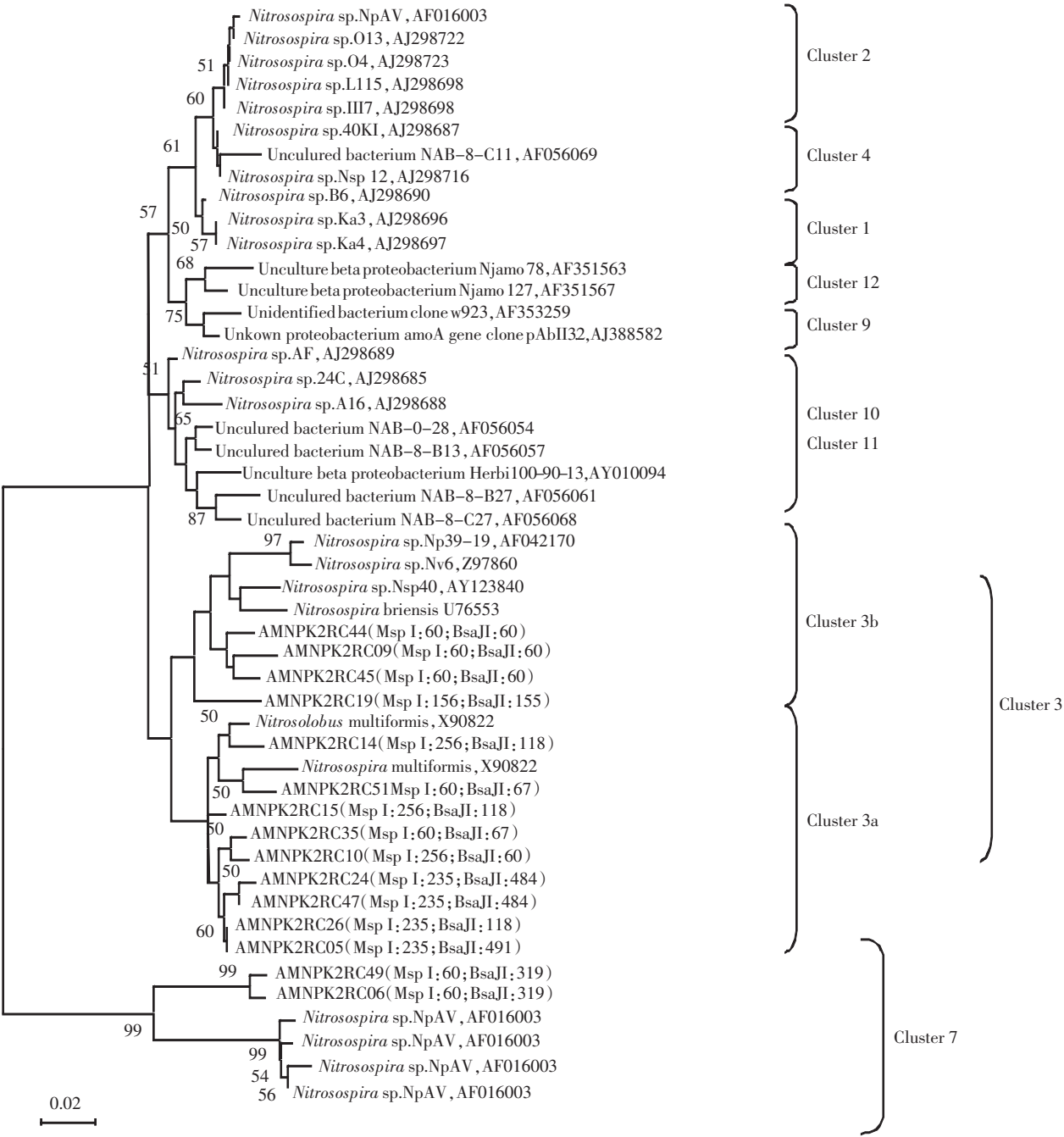


图 2 基于部分 *amoA* 氨基酸(150 个)序列建立的氨氧化细菌系统进化树(Neighbor-joining)
Figure 2 Phylogenetic tree of ammonia-oxidizing bacteria based on partial *amoA* sequences (150 amino acids)

67 bp、118 bp、155 bp 和 484 bp, 利用 *Msp* I 和 *Bsa* II 这两种内切酶对测序结果进行统计分析, 可以将氨氧化细菌 *Nitrosospira* 和 *Nitrosomanas* 两个属的片段加以区别。

2.3 氨氧化细菌群落结构与土壤理化性质相关性

氨氧化细菌群落结构与土壤理化性质的相关性列于图 3。可以看出, 氨氧化细菌的群落结构与土壤有机质($r=0.461$, $F=23.915$, $P=0.002$)、全磷($r=0.304$, $F=12.243$, $P=0.002$)、pH 值($r=0.241$, $F=8.883$, $P=0.004$)和硝态氮($r=0.177$, $F=6.020$, $P=0.018$)含量等均呈显著相关, 而与土壤全钾含量无相关性。由于土壤有机质和 pH 值等理化指标的变化在很大程度上与施肥及管理等因素密切相关, 可以认为土壤中氨氧化细菌的群落很大程度上受耕作和施肥的影响。

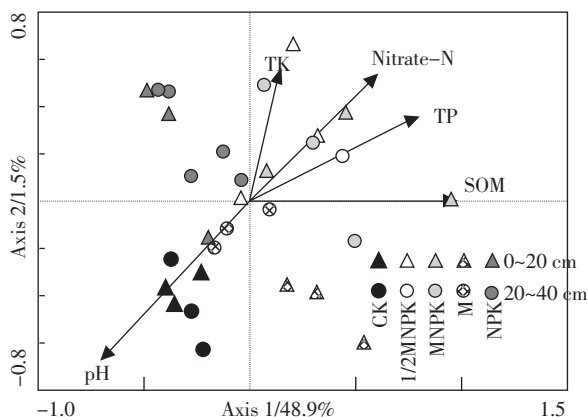
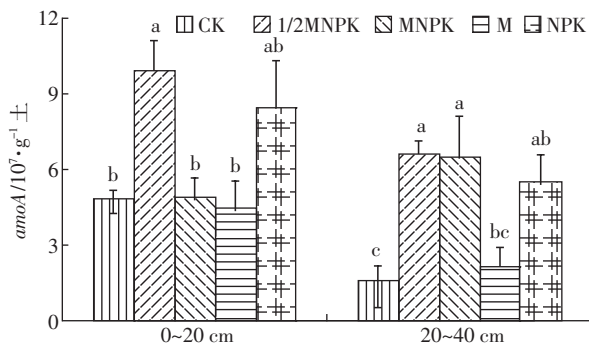


图 3 RDA 分析氨氧化细菌群落结构与土壤性质的相关性
Figure 3 Correlations of soil properties with the community structure of ammonia-oxidizing bacteria as determined by redundancy analysis

2.4 施肥对氨氧化细菌丰度的影响

本研究中, 对不同施肥处理下土壤中氨氧化细菌 *amoA* 基因拷贝数的变化情况进行了相应分析, 其结果如图 4。

不同施肥处理、不同土层的氨氧化细菌 *amoA* 基因拷贝数均有明显差异。其中, CK 和 M 处理土壤中氨氧化细菌 *amoA* 基因拷贝数均较低, 而 1/2MNP 和 NPK 处理土壤中 *amoA* 基因拷贝数则一般均较高。MNP 处理下土壤中氨氧化细菌的基因拷贝丰度并没有因为施肥量较高而达到最大, 在 0~20 cm 土层中反而低于 1/2MNP 和 NPK 处理, 在 20~40 cm 土层中亦低于 1/2MNP 处理。在 0~20 cm 和 20~40 cm 两个土层中, 氨氧化细菌的丰度均以 1/2MNP 处理最高, *amoA* 基因拷贝数分别达到每克土 9.95×10^7 拷



a、b、c 代表同一土层不同处理之间的差异分析,
不同字母之间差异显著 ($P < 0.05$)

Numbers in the same layer followed by a, b or c are significantly different according to LSD test of multiple comparisons

图 4 不同施肥处理土壤中氨氧化细菌 *amoA* 基因的拷贝数
Figure 4 *amoA* copy numbers in different fertilizer treatment and soil layers

贝数和每克土 6.65×10^7 拷贝数, 比 CK 处理增加 105.0% 和 315.3%。根据氨氧化细菌 *amoA* 功能基因拷贝数的统计分析结果, 施肥对氨氧化细菌丰度具有显著影响 ($P=0.028 < 0.05$), 而不同土层间比较, 氨氧化细菌丰度无明显差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

土壤微生物多样性会对农业管理措施产生及时而准确的响应。施肥对土壤微生物多样性及活性的影响非常复杂, 可能与肥料的种类、施用方式、土壤类型和管理方式等多种因素有关^[18]。本文采用 PCR-TR-FLP 与定量 PCR 技术相结合的方法, 研究了设施菜地不同施肥下氨氧化细菌的种类及丰度变化。氨氧化细菌功能基因 *amoA* 经过 *Msp* I 酶酶切后主要得到了 4 个片段, 且每个样品中都包含这 4 个片段, 只是它们所占百分比不同。将 T-RFLP 结果与克隆测序结果结合分析后发现, 研究土壤中氨氧化细菌包括 *Nitrosospira* 和 *Nitrosomanas* 两个属, *Nitrosospira* 属的氨氧化细菌为优势种群, 占 90% 左右, *Nitrosomanas* 属的氨氧化细菌仅占 10% 左右。该结果与 Kowalchuk 等^[19]报道的土壤中硝化细菌以 *Nitrosospira* 属为主, 而非 *Nitrosomanas* 属的结论一致, 也与很多研究^[20] 认为的 *Nitrosospira* 细菌在氨氧化过程中发挥主要作用一致。但与 Fan 等^[21]和 Li 等^[22]报道不尽一致的是, 本研究中除 *Nitrosospira* 属氨氧化细菌为主外, 还含有少部分 *Nitrosomanas* 属的氨氧化细菌, 说明受设施环境及施肥的影响, 氨氧化细菌的种类可能会变得更丰富。本研究设施土壤中大部分氨氧化细菌属于 *Nitrosospira*

cluster 3, 各处理中均以 *Nitrosospira* cluster 3a 和 *Nitrosospira* cluster 3b 为优势种群, 只是所占比例有差别。一般认为, 不同氮素浓度会引起氨氧化细菌种属的改变, 这是由于不同类型氨氧化细菌对基质^[23]和铵浓度的敏感度不同所致^[24]。Kowalchuk 的研究中施用氮肥刺激了 *Nitrosospira* cluster 3 的生长, 导致其成为土壤中的优势菌属^[25], Belse 等^[26]亦认为在铵浓度较高的条件下, *Nitrosospira* cluster 3 能够更好地生长。但是, Avrahami 等^[17]指出 *Nitrosospira* cluster 3 不一定需要在较高铵浓度下才能成为优势菌属, Chu 等^[8]发现在不施肥处理下 *Nitrosospira* cluster 3 也是优势菌属。本研究亦证实, *Nitrosospira* cluster 3 不仅在施用高氮条件下是优势菌属, 即使在氮肥施用适中、甚至不施氮肥的对照处理中, *Nitrosospira* cluster 3 也是优势菌属。*Nitrosospira* cluster 3a 和 *Nitrosospira* cluster 3b 对铵浓度的要求表现出不同的趋向性^[17]。Chu 等^[8]研究表明, 长期施用氮肥后, 土壤中 *Nitrosospira* cluster 3a 氨氧化细菌的丰度明显增加。本研究中, 由于 60 bp 片段同时属于 *Nitrosospira* cluster 3a 和 *Nitrosospira* cluster 3b 两个属, 即使用 *Bsa* II 酶切仍不能将两个属的完全分开, 所以不能准确区分出 *Nitrosospira* cluster 3a 和 *Nitrosospira* cluster 3b 这两个属百分比的变化。

有机质可以为自养型氨氧化细菌的生长提供丰富的养分, 因此有机质含量丰富的土壤中, 如表层和施用有机肥的土壤中, 氨氧化细菌的多样性和丰度也较高。施肥会引起土壤 pH 值的变化, 尤其是长期施用化肥会导致土壤酸化。很多研究表明, 土壤 pH 值是影响硝化作用的重要因素^[13], 低 pH 值可限制硝化细菌的生长, 不利于硝化过程的进行, 从而影响土壤氮素循环。pH 值也是影响氨氧化细菌和古菌群落多样性、数量和活性的主要因素^[27]。本研究通过 T-RFs 片段分析同样得出有机质和 pH 值与氨氧化细菌群落结构具有十分显著的相关性。

氨氧化细菌不仅对土壤中氮素转化具有十分重要的作用, 而且也是土壤中更容易受到外界条件变化影响的一类微生物。传统的计数培养法很难精确估算出环境条件对氨氧化细菌这类难以在人工条件下培养的微生物丰度的影响。采用荧光定量 PCR 技术不仅可以解决以上问题, 而且可以准确反映微生物的细微变化。运用荧光定量 PCR 技术研究氨氧化细菌数量的变化已经有很多报道, 如 Okano 等^[11]利用 real-time PCR 研究了不同铵浓度对氨氧化细菌数量的影响, 发现其数量随铵浓度的增加而增加, 最高达到

每克土 6.6×10^7 个细胞。Hermansso 等^[10]的研究也指出, 施氮处理的土壤中氨氧化细菌数量达到每克干土 6.2×10^7 拷贝数, 比不施肥处理的土壤高出 3 倍多。在本研究中, 氨氧化细菌丰度的最大值并不是出现在施肥量最高的 MNPK 处理, 而是出现在 1/2MNPK 处理 0~20 cm 土层, *amoA* 基因数达到每克干土 9.95×10^7 拷贝数。该结果与前人的结果并不完全一致^[11], 说明对于设施菜地而言, 由于环境条件与大田差异明显, 施肥的影响也可能因此而有所差别。同一施肥处理下, 一般 0~20 cm 土层中氨氧化细菌的丰度高于 20~40 cm 土层, 这是因为表层土壤中氧气相对充足且土壤肥力较高, 更适宜好氧型氨氧化细菌的生长。

4 结论

本文采用 T-RFLP 和定量 PCR 结合的技术, 系统研究设施菜地不同施肥处理后氨氧化细菌的群落结构和丰度的变化。结果表明:

(1) 设施菜地土壤中氨氧化细菌的优势菌为 *Nitrosospira* cluster 3 属, 但也包括有少量的 *Nitrosomanas* cluster 7 属氨氧化细菌, 意味着在设施栽培与施肥条件下土壤中氨氧化细菌的种类可能比大田更丰富。

(2) 施肥对土壤中 *Nitrosospira* cluster 3a 和 *Nitrosospira* cluster 3b 的丰度和相对百分比具有显著影响。相关分析结果表明, 有机质含量和 pH 值均是导致氨氧化细菌群落结构差异的主要原因。荧光定量 PCR 技术分析发现, 施肥是导致氨氧化细菌丰度差异的主要原因。

本研究结果为进一步开展氨氧化细菌参与的设施菜地氮素循环与转化研究, 制定设施菜地合理施肥量等, 均具有重要的参考意义。

参考文献:

- [1] Phillips C J, Harris D, Dollhopf S L, et al. Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 5410-5418.
- [2] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 485-529.
- [3] Woese C R, Weisburg W G, Paster B J, et al. The phylogeny of the purple bacteria: The gamma subdivision[J]. *System Applied of Microbiology*, 1985, 6: 25-33.
- [4] 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:

- 4147–4154.
- [5] Arp D J, Sayavedra Soto L A, Hommes N G. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*[J]. *Archives of Microbiology*, 2002, 178(4):250–255.
- [6] Rothauwe J H, Witze 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(2):4704–4712.
- [7] Cébron A, Berthe T, Garnier J. Nitrification and nitrifying bacteria in the Lower Seine River and Estuary (France)[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12):7091–7100.
- [8] 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.
- [9] 辜运富, 云翔, 张小平, 等. 不同施肥处理对石灰性紫色土微生物数量及氨氧化细菌群落结构的影响[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(12):4119–4126.
- Gu Y F, Yun X, Zhang X P, et al. Effect of different fertilizer treatments on soil microbes and ammonium oxidizing bacterial community in a calcareous purple paddy soil[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(12):4114–4126.
- [10] Hermansson A, Lindgren P E. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67:972–976.
- [11] Okano Y, Hristova K R, Leutenegger C M, et al. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70:1008–1016.
- [12] Horz H P, Barbrook A, Field C B, et al. Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(42):15136–15141.
- [13] 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 soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6):1601–1611.
- [14] 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, 9:2364–2374.
- [15] Chen X P, Zhu Y G, Xia Y, et al. Ammonia-oxidizing archaea: Important players in paddy rhizosphere soil?[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10:1978–1987.
- [16] Wang Y N, 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, 32:27–36.
- [17] Avrahami S, Conrad R, Liesack W. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(8):691–705.
- [18] 周桔, 雷震. 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):306–311.
- [19] Kowalchuk G A, Stephen J R, De Boer W, et al. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β -subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(4):1489–1497.
- [20] Stefan J, Gabriele T, Markus S, et al. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(8):3042–3051.
- [21] Fan F L, Zhang F S, Lu Y H. Linking plant identity and interspecific competition to soil nitrogen cycling through ammonia oxidizer communities[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(1):46–54.
- [22] Li X X, Ying J Y, Chen Y. Effects of nitrogen addition on the abundance and composition of soil ammonia oxidizers in Inner Mongolia Grassland[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(3):174–178.
- [23] Webster G, Embley T M, Freitag T E, et al. Links between ammonia oxidizer species composition, functional diversity and nitrification kinetics in grassland soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7:676–684.
- [24] Suwa Y, Imamura Y, Suzuki T, et al. Ammonia-oxidizing bacteria with different sensitivities to $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in activated sludges[J]. *Water Resources*, 1994, 28:1523–1532.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Nicol G W, Leininger S, Schleper C, et al. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10:2966–2978.