

长期施用氮肥和磷肥对渭北旱塬土壤中 氨氧化古菌多样性的影响

武传东¹, 闫倩¹, 辛亮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:采用基于氨单加氧酶基因的 PCR-RFLP 和 DNA 测序技术,以黄土高原旱地黑垆土为材料,研究长期施用氮肥和磷肥对土壤氨氧化古菌多样性的影响。结果显示,不同施肥处理土壤样品得到的氨氧化古菌的 OTU 数分别为 25(种植不施肥,CK)、21(不施肥不种植,LD)、18(单施氮肥,N)、25(单施磷肥,P)和 13(氮、磷共施,NP)。氨氧化古菌的多样性指数 H' 和优势度指数 D_s 变化趋势基本相同,分别为 $P>CK>LD>NP>N$ 和 $P>CK>NP>LD>N$;种群丰富度和均匀度指数在不同处理间变化较大,分别为 $CK>P>LD>N>NP$ 和 $P>NP>LD>N>CK$ 。各处理优势氨氧化古菌绝大部分属于 Cluster S,少数属于 Cluster M,获得的序列全部属于难培养泉古菌门。不同施肥方式的长期定位试验土壤中氨氧化古菌多样性变化较大,而优势氨氧化古菌系统进化定位没有显著变化。

关键词:氨氧化古菌;长期施肥;多样性;群落结构

中图分类号:S154.36 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)04-0743-07

Effects of Long-term Nitrogen and Phosphate Fertilization on Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea in Dry Highland Soil of Loess Plateau, China

WU Chuan-dong¹, YAN Qian¹, XIN Liang², WANG Bao-li^{1*}, QU Dong²

(1.College of Life Sciences, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi; 2.College of Resources and Environment, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi)

Abstract: Ammonia-oxidizing archaea are likely the most abundant ammonia-oxidizing microbes in natural environment and they also play an important role in nitrification. In order to improve nitrogen use efficiency and explicate the indicating function of ammonia-oxidizing archaea (AOA) on changes of soil quality in the Loess Plateau, AOA community structure diversity was studied. The soil samples used in this research derived from Changwu Agro-ecological Experimental Station on the Loess Plateau, Chinese Academy of Sciences, which had received 23 years continuous fertilization treatments, include CK (control, without fertilizers), LD (unplanted, without fertilizers), N (nitrogen input), P (phosphorus input) and NP (combination of nitrogen and phosphorus fertilizers). The soil AOA community structure diversity was analyzed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and DNA sequence. Positive clones collected randomly from clone libraries were digested by *Rsa* I and *Msp* I, respectively. According to the statistics of diversity index, there were 25, 18, 29, 20 and 30 restriction endonuclease types (OTUs), respectively. The α diversity indices indicated that there was a pronounced difference among five fertilizer treatments. The OTUs were the highest in both P treatment and CK treatment, while the lowest in NP treatment. The rescaled distance matrix tree indicated that the different fertilization had weak convergence of AOA community types with the CK treatment soil. Phylogenetic tree of *amoA* gene amino acid sequences analysis showed all AOA sequences fell within cluster S and cluster M, but the proportions were different. These results indicated that long-term fertilization resulted in change of AOA community diversity; however, different fertilizer alkaline soil had no significant impact on the species composition of dominant AOA.

Keywords: ammonia-oxidizing archaea; long-term fertilization; diversity; community structure

收稿日期:2011-09-17

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:武传东(1984—),男,山东临沂人,硕士研究生,主要从事土壤微生物多样性研究。E-mail:wued1984@163.com

* 通讯作者:王保莉 E-mail:wbl@nwsuaf.edu.cn

作为硝化作用的限速步骤,氨氧化作用微生物学研究在氮素生物地球化学循环过程中一直倍受关注^[1]。传统认为,硝化作用的第一步是由 β 和 γ 变形菌门的自养的氨氧化细菌(*Ammonia-oxidizing bacteria*, AOB)来完成的。作为氨氧化过程的主要驱动者,氨氧化细菌已被作为环境微生物生态学研究的一种模式生物^[1]。随着环境微生物分子生态学技术的发展和研究的深入,人们发现了另一类具有氨氧化能力的微生物——氨氧化古菌(*Ammonia-oxidizing archaea*, AOA)^[2],它们是一类以重碳酸盐为碳源、利用铵态氮氧化产生细胞能量进行化能无机自养生长的独立于 AOB 进化分枝外的进化类群,属于泉古菌门(*Crenarchaeota*)^[3]。2005 年 Könneke 等^[4]首次从海洋沉积物中分离得到一株具有硝化作用的古生菌。现已证明,AOA 广泛分布于海洋、土壤、温泉和湿地等各种类型的生态系统中,表明氨氧化古菌是环境中最丰富的氨氧化微生物之一。

自 2005 年 Treusch 等^[5]在土壤环境中发现了具有氨氧化功能的泉古菌 *amoA* 基因,首次揭示了土壤中存在难培养的中温泉古菌氨氧化基因之后,人们开始关注土壤环境中氨氧化古菌对氨氧化过程的贡献、与土壤硝化速率的关系以及影响氨氧化古菌群落结构和丰度的环境因素。2006 年 Leininger 等^[6]报道了原始土壤和农业土壤中细菌和古菌关键功能基因 *amoA* 的相对丰度,发现土壤中这些来源广泛的硝化古菌可能是细菌的 3 000 倍之多,并且氨氧化古菌的群落结构在不同土层深度是不相同的,这反映出在土壤环境中可能存在不同生态类型的氨氧化古菌。Yamamoto 等^[7]分析了牛粪堆肥过程中的氨氧化菌的相对多样性和丰度,结果表明氨氧化古菌的群落多样性低于氨氧化细菌,但是氨氧化古菌的丰度在碱性环境下明显高于氨氧化细菌。土壤微生物的数量和种类在长期施肥条件下会产生显著变化^[8]。Di 等^[9]对高施尿素氮肥的种植牧草土壤研究表明,土壤中高丰度氨氧化古菌的存在,可能在氨氧化过程中起潜在作用;氨氧化细菌在高氨环境下生长,而氨氧化古菌在低氨、不利的或贫瘠的环境中占主导地位。Wang 等^[10]对中国 4 种富氮湿地土壤中氨氧化菌的多样性和丰度的研究显示,氨氧化古菌广泛分布于各种湿地土壤中,高铵的表层土壤中氨氧化古菌数量明显低于氨氧化细菌,并且受土壤 pH 影响较大。Mao 等^[11]认为土壤硝化速率与氨氧化古菌数量相关性高于与氨氧化细菌的。Yao 等^[12]认为酸性土壤 pH 值变化是影响氨氧化细菌和古菌

群落结构的重要因素,只有氨氧化古菌丰度与硝化潜势具有相关性。Wertz 等^[13]对林地土壤的研究结果则显示施用氮肥没有增加氨氧化古菌丰度。

鉴于目前对于黄土高原地区长期定位施肥土壤中氨氧化菌群落多样性变化特征的相关研究甚少,我们于 2010 年首次报道了陕西长武长期施肥生态试验站的黄土高原试验区土壤氨氧化细菌的群落结构特点^[14-15],并开展了对氨氧化古菌的相关研究。本文以长期定位施肥土壤为研究对象,采用基于氨氧化古菌氨单加氧酶基因 *amoA* 的 PCR-RFLP 和 DNA 测序技术,探讨长期施用氮肥和磷肥对氨氧化古菌群落结构多样性的影响,为进一步研究黄土高原地区土壤长期施肥过程中氨氧化细菌和氨氧化古菌与土壤硝化作用的关系及其贡献率提供必要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

本试验土壤样品于 2008 年 7 月采自黄土高原农业生态站长期施肥试验区,该站位于陕西省长武县,北纬 35°12',东经 107°40',海拔 1 200 m。土壤属黑垆土,孔隙度为 50%左右,通透性良好。试验区始于 1984 年,设置 5 个处理:不施肥种植(CK)、不施肥不种植(LD)、单施氮肥(N)、单施磷肥(P)和氮、磷共施(NP)。其中,氮肥(尿素)施入量为 120 kg·hm⁻²,磷肥(过磷酸钙)施入量为 60 kg·hm⁻²。试验小区面积为 6.5 m×10 m,小区间距 0.5 m,区组间距 1 m。田间管理同当地大田管理,连作冬小麦,试验区采用完全随机区组排列,每个处理设置 3 个重复,其中 LD 处理的管理同其他处理,定期拔除杂草。

1.2 土壤样品处理及理化性质的测定

以耕层土壤为供试土样。采集样品时,将表层 0~5 cm 土层去除,以消除紫外线对土壤微生物的影响。采集深度 5~25 cm 的耕层土壤,每 5~7 个点混合成 1 个土壤样品,去除杂物,取 1 kg 左右土壤样品,装入袋中密封。一部分用于土壤理化性质的分析,剩余的土壤样品立即放于-80℃冰箱冷冻保存。土壤基本理化性质参见文献[13]。

1.3 土壤氨氧化古菌群落多样性的 PCR-RFLP 分析

1.3.1 土壤总 DNA 提取

参考有关文献的方法^[16]提取土壤样品微生物总 DNA。称取 0.300 g 土样,加液氮充分研磨提取,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 80 V 电压

下电泳 40 min, DNA 回收试剂盒回收。

1.3.2 氨氧化古菌 *amoA* 基因的扩增与克隆文库的构建

氨氧化古菌 *amoA* 基因的引物参考文献[17], 其上上游引物为 Arch-*amoA*F (5'-STA ATG GTC TGG CTT AGA CG-3', [S=G or C]), 下游引物为 Arch-*amoA*R (5'-GCC GCC ATC CAT CTG TAT GT-3'), *amoA* 基因的 PCR 扩增片段大小为 635 bp。

氨氧化古菌 *amoA* 基因的 PCR 扩增反应体系: 引物(25 mmol·L⁻¹)各 1.0 μL, 适当稀释的 DNA 模板 1.0 μL, Premix Taq[®] DNA 聚合酶 20.0 μL, ddH₂O 补充至总体积 50 μL。PCR 热循环参数为: 94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 30 s, 55 ℃复性 60 s, 72 ℃延伸 45 s, 扩增 30 个循环; 72 ℃延伸 7 min, 16 ℃保存。将扩增产物与 pGEM[®]-T 载体进行连接反应, 转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞中, 建立不同施肥处理土壤氨氧化古菌 *amoA* 基因的克隆文库。采用蓝白斑筛选阳性克隆子。

1.3.3 氨氧化古菌 *amoA* 基因的克隆文库的 RFLP 分析

从大于 400 个克隆子的文库中随机挑取阳性克隆子, 用通用引物 M13 进行菌落 PCR 扩增。*amoA* 基因的 PCR 产物纯化后用 *Rsa* I 和 *Msp* I 分别进行酶切, 酶切产物用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 h, 硝酸银染色照相。分析 RFLP 酶切带型图谱, 将每一类带型定义为一个分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU)。

1.3.4 氨氧化古菌系统发育树的构建

从每个处理的克隆文库的优势克隆中随机挑取 1~3 个克隆子测序, 将测序得到的 *amoA* 基因序列在 GenBank 数据库中进行比对, 挑取相似性大于 90% 的

序列作为参比序列, 构建系统发育树。测序得到的氨氧化古菌 *amoA* 基因序列已经提交到 GenBank 中, 登录号为 HQ875149~HQ875249。

1.4 数据分析

综合 RFLP 统计的数据, 计算不同处理氨氧化古菌 α 多样性指数^[14]。用 MEGA 4.0 软件构建氨氧化古菌 *amoA* 基因系统发育树。

2 结果与分析

2.1 氨氧化古菌 *amoA* 基因克隆文库的 RFLP 分析

从 5 种不同处理土样的克隆文库中随机挑取大约 150 个阳性克隆子进行菌落 PCR 扩增, 纯化产物分别用 *Rsa* I 和 *Msp* I 酶切, 其部分酶切图谱如图 1 所示。

统计所有双酶切图谱酶切分型后得到不同处理中氨氧化古菌 OTU 类型及所占比例, 结果见图 2。5 种不同处理土样中, P 处理与 CK 产生 25 种 OTU 类型, 其次为 LD 处理 21 种, N 处理 18 种, NP 处理的氨氧化古菌 OTU 类型最少, 为 13 种。在这 5 种处理中只出现一次的酶切类型(即单一克隆)所占克隆文库的比例由多到少依次为: CK(8.00%)、N(7.05%)、P(7.05%)、LD(6.41%)、NP(2.56%)。各处理均出现明显的优势菌群, 其所占比例如下: N 处理分别为 56.41%、14.74%、13.46%; CK 处理为 43.33%、16.00%、13.33%、3.33%; LD 处理为 56.41%、8.33%、7.69%、5.13%、4.49%、3.21%; NP 处理为 44.87%、29.49%、6.41%、4.49%、3.85%、3.21%; P 处理为 33.33%、19.23%、7.69%、7.05%、5.13%、3.85%、3.21%、3.21%。可以看出, 在 5 种不同处理中, 随着优势菌群多样性的增加, 其均一度逐

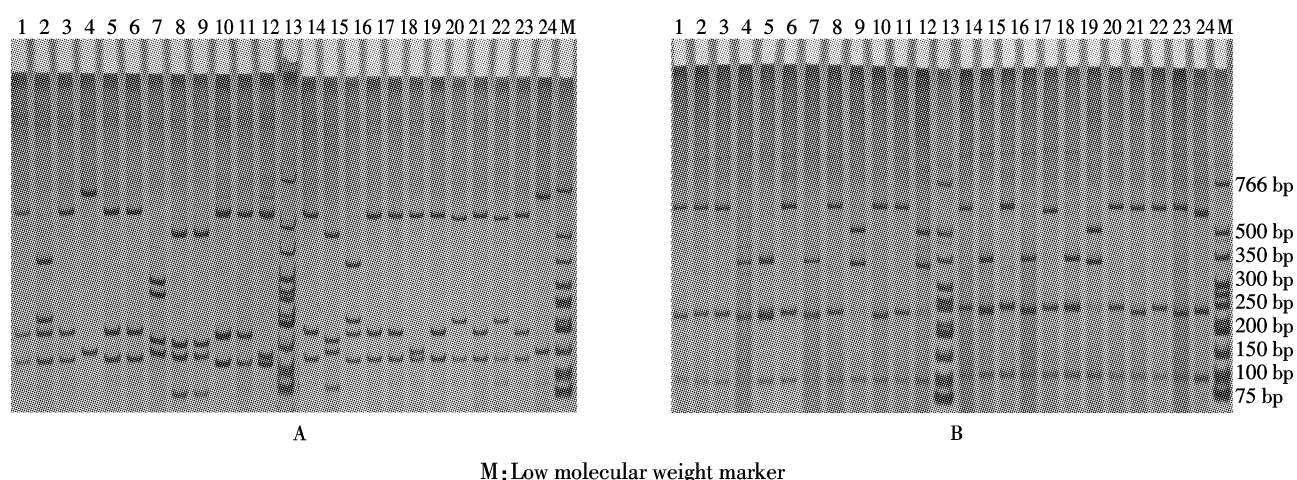


图 1 氨氧化古菌 *amoA* 基因部分克隆子的 *Rsa* I (A) 和 *Msp* I (B) 酶切图谱
Figure 1 Partial RFLP patterns of *amoA* clones digested by *Rsa* I (A) and *Msp* I (B)

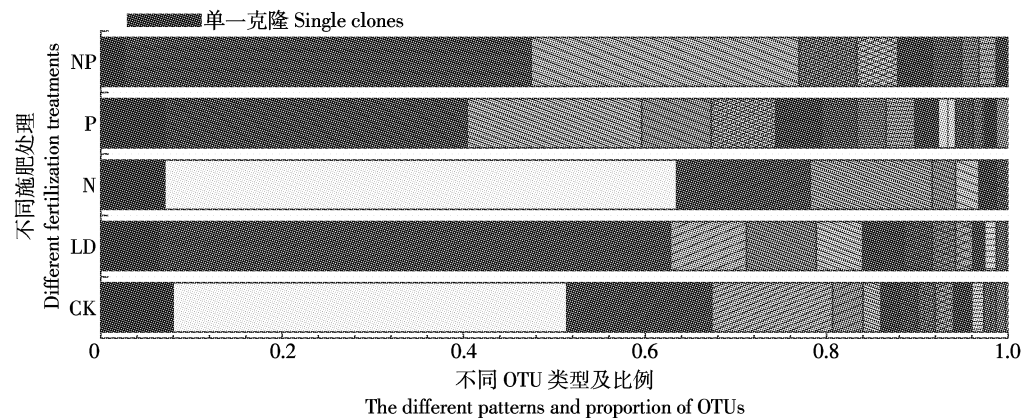


图 2 5 种施肥处理土样氨氧化古菌 *amoA* 基因的 RFLP 统计结果
Figure 2 Statistic results of RFLP of *amoA* gene in five fertilization treatments

表 1 各土壤样品中氨氧化古菌 *amoA* 基因克隆文库的多样性指数分析
Table 1 Diversity indices of *amoA* clone libraries from different soil treatments

处理 Treatments	库容值 Coverage(<i>C</i>)	香农指数 Shannon-wiener index(<i>H'</i>)	辛普森指数 Simpson index(<i>D</i> _s)	丰富度 Richness(<i>d</i> _{Mn})	均匀度 Evenness(<i>E</i>)
CK	92.00%	2.08	0.76	4.79	0.42
LD	93.59%	1.79	0.66	3.96	0.59
N	92.95%	1.55	0.64	3.37	0.54
P	92.95%	2.34	0.83	4.75	0.73
NP	97.44%	1.61	0.70	2.38	0.63

渐上升。N 和 CK 处理中出现一类相同 OTU 类型的优势菌群(见图 2 白色图形)所占比例分别为 56.41%和 43.33%,其他处理间均无相同 OTU 类型的菌群。

2.2 不同处理土壤样品中氨氧化古菌多样性指数分析

对 5 个处理的氨氧化古菌 *amoA* 基因克隆文库酶切类型进行多样性指数分析,结果见表 1。本试验 5 个处理所得到的库容值均在 92.00%以上,表明克隆文库的覆盖程度较高,文库能够较好地代表土壤中氨氧化古菌 *amoA* 基因的群落结构多样性。

长期不同施肥方式导致土壤中氨氧化古菌群落结构发生明显改变,4 种多样性指数在各处理中均出现不同变化,其中:单施 P 处理的 *H'* 指数、*D*_s 指数和 *E* 指数最高,而单施 N 肥处理的 *H'* 和 *D*_s 指数最低;NP 处理的 *d*_{Mn} 指数最低;CK 处理的 *E* 指数最低。多样性指数 *H'* 和优势度指数 *D*_s 分别为 P>CK>LD>NP>N 和 P>CK>NP>LD>N,两者变化趋势基本相同,表明长期单施氮肥处理使土壤中氨氧化古菌群落多样性降低,而单施磷肥在一定程度上增加了其多样性。不同处理土壤氨氧化古菌种群丰富度 *d*_{Mn} 指数为 CK>P>LD>N>NP,种群均匀度 *E* 指数为 P>NP>LD>N>CK,长期不同施肥处理对土壤氨氧化古菌种群多样

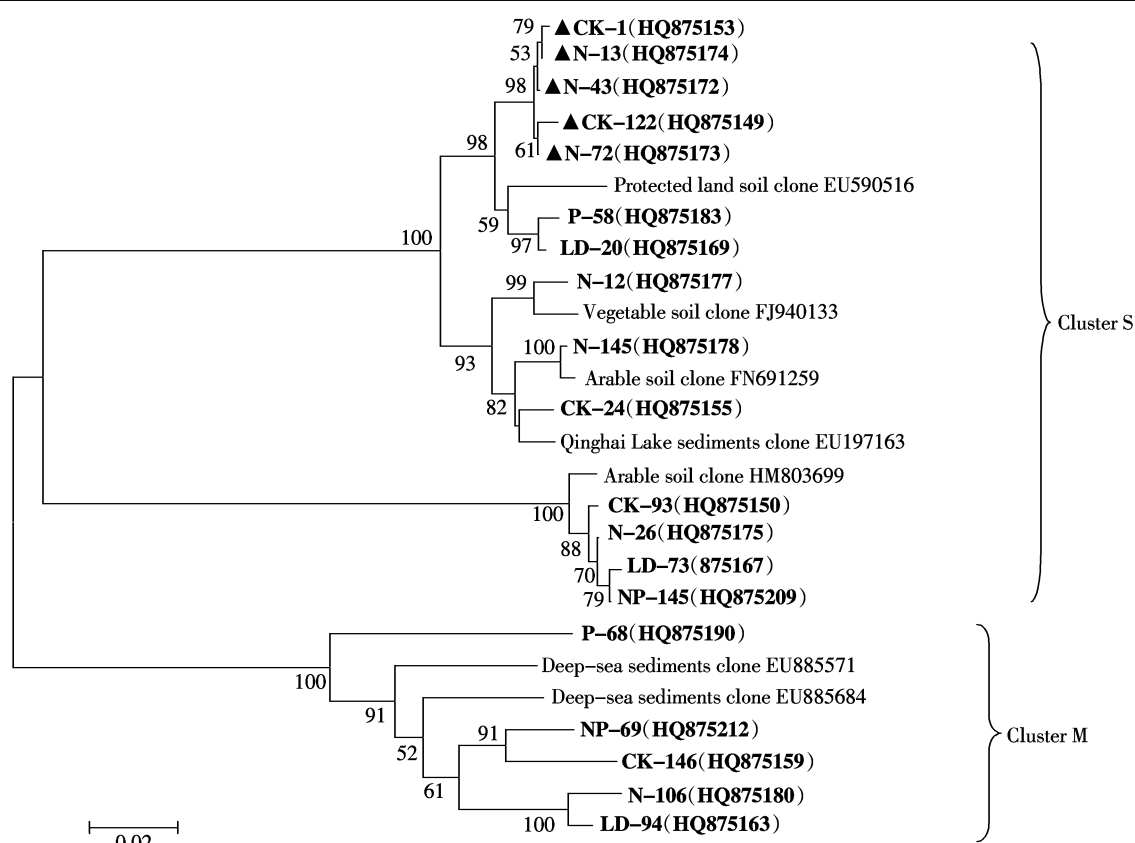
性影响较大。不同处理中 4 种多样性指数的变异系数 *CV* (variation coefficient) 分别为 17.73%(*H'*)、10.81%(*D*_s)、20.29%(*d*_{Mn})和 19.64%(*E*),表明本试验中种群丰富度和均匀度是进行不同处理间比较的较为敏感的指数。

2.3 优势氨氧化古菌群落组成分析

通过对各处理克隆文库的 RFLP 分析,挑取优势克隆子测序。在 GenBank 数据库中比对优势克隆子 *amoA* 基因序列,选择数据库中相似性大于 90%的序列作为参比序列,进行同源性分析,采用 N-J 法构建氨氧化古菌 *amoA* 基因系统发育树。

由图 3 可以看出,本试验各处理优势氨氧化古菌绝大部分属于 Cluster S,它们分别与来自耕地土壤、保护地土壤和青海湖沉积物等的氨氧化古菌聚在同一分支上;少数氨氧化古菌序列属于 Cluster M,与来自深海沉积物中的氨氧化古菌 *amoA* 基因序列聚集在同一分支上,均属于难培养泉古菌门(Uncultured Crenarchaeota)。

从系统进化树结果还可以看出,N 处理的优势氨氧化古菌类群 N-13、N-43 和 N-72 与 CK 处理的优势氨氧化古菌类群 CK-1 和 CK-122 聚在同一分支



黑体字代表本文得到的 *amoA* 基因序列,步长值(>50%)表示核苷酸替换率,刻度尺表示 2% 序列估计偏差

Boldface type indicates *amoA* gene sequences obtained in this study. Bootstrap values(>50%) represent nucleotide substitution rate, and the scale bar represents 2% estimated sequence divergence.

图 3 基于 *amoA* 基因序列构建的氨氧化古菌系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree constructed with neighbour-joining methods based on *amoA* gene sequences

上,而且具有相同的酶切类型(图 3 黑色三角所示)。不同施肥处理的优势氨氧化古菌在 Cluster S 和 Cluster M 中均有分布,证明长期施肥处理对碱性黑垆土优势氨氧化古菌群落系统进化定位未产生明显影响。

3 讨论

土壤中的微生物群落丰富复杂,仅用单一指数模式不可能对其特征做出全面描述。本文依据各多样性指数的含义及公式演变关系,引用了 4 种描述群落结构特征的多样性指数,以期从多角度和维度上对土壤中的微生物群落结构进行较为全面的描述,其中 Shannon-Wiener 指数同时考虑到了物种数量和不同物种均匀度,无论哪个成分发生变化,都会导致该指数变大,适用于比较相似生态系统或生境的情况,而 Simpson 指数偏重于样本中丰度较高的物种,即增加丰度很小的物种对该指数影响不大,这两个指数分别

从不同的侧重点反映群落的多样性情况。采用基于氨单加氧酶基因的 RFLP 技术并结合基因序列分析,我们研究了长期施用氮肥和磷肥对渭北旱塬土壤氨氧化菌群落特征的影响。先前的研究^[14]显示长期单施氮肥土壤中氨氧化细菌多样性指数 Shannon-Wiener (H')和 Margalef(d_{Ma})均最高,其次是 CK、NP 和 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,单施磷肥和氮磷共施后土壤中氨氧化细菌的多样性有所降低。本研究单施磷肥处理的土壤中氨氧化古菌的 H' 和 d_{Ma} 多样性指数均高于其他处理,而单施氮肥和氮磷共施处理的多样性低于种植不施肥的对照处理,与不种植不施肥处理接近。上述结果产生的原因可能与长期不同施肥处理导致的氨氧化古菌产生的优势菌群所占比例有关(图 2)。N 和 LD 处理最大优势菌群所占比例高达 56.41%,NP 处理的最大优势菌群所占比例为 44.87%,CK 处理的为 43.33%,P 处理的为 33.33%。显然,P 处理的最大优

势菌群所占比例最小,因而种群的多样性和均匀度高。优势氨氧化古菌菌群的大量生长繁殖,抑制了其他菌群的生长,影响了氨氧化古菌的种群多样性。

目前,关于无机氮肥对土壤氨氧化菌群落结构和丰度的影响的报道较多。He等^[18]对湖南祁阳红壤中氨氧化菌丰度和多样性的研究发现,长期施肥导致酸性红壤 pH(3.71~5.81)发生了变化,影响了土壤氨氧化古菌的群落结构。Di等^[9]的研究表明氨氧化菌选择在不同氮素水平土壤中生长,但氨氧化古菌在过高浓度的氮素土壤中的生长被抑制。Shen等^[19]对河南封丘长期施肥土壤的研究显示,长期施用氮肥可以增加供试碱性土壤氨氧化细菌的丰度,但是不同施肥方式对其氨氧化古菌群落结构没有产生显著影响。对酸性土壤和碱性土壤做同样的施肥处理,发现在碱性土壤中,只有氨氧化细菌的群落结构发生了变化,而在酸性土壤中只有氨氧化古菌的群落结构发生了变化^[18-19]。对酸性土壤施肥实验中,土壤 pH 和氨氧化细菌、氨氧化古菌的丰度呈现正相关^[18],碱性土壤 pH 变化与氨氧化细菌的丰度存在负相关^[19]。Nicol等^[20]的研究表明,随着酸性土壤 pH 上升,古菌 *amoA* 基因和转录丰度降低,而细菌 *amoA* 基因丰度降低,但是转录丰度则增加。本文的供试土样属于弱碱性的黑垆土,长期施肥对土壤 pH 影响不大,单施氮肥和氮磷共施处理的土壤 pH 分别为 8.39 和 8.35^[14],与不施肥对照的相近,但氨氧化古菌的多样性均低于对照处理,表明土壤 pH 不是影响本试验中土壤氨氧化古菌多样性变化的主要原因。

单施磷肥对土壤氨氧化菌影响的相关研究报道不多。Herfort等^[21]研究发现,北海中泉古菌 *amoA* 基因拷贝数与低浓度磷酸盐 ($0.05\sim0.31\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 呈正相关,但与高磷酸盐浓度 ($>0.66\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 呈负相关,该结果暗示高浓度磷酸盐可能抑制氨氧化古菌生长。Beman等^[22]研究结果却与之相反,发现加利福尼亚海湾表层水中磷酸盐浓度大于 $0.3\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,氨氧化细菌数量很少,甚至没有检测到,而氨氧化古菌 *amoA* 基因拷贝数在水中达到了 1.3×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$; Sahan等^[23]研究也表明,在磷酸盐浓度高达 $7\sim115\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的江河口生态系统中,检测到了古菌 *amoA* 基因。由此推测,本试验中长期磷肥的施入,导致土壤中可利用的有效磷浓度由 $0.311\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 增加到 $6.511\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[14],合适的有效磷浓度在一定程度上促进了氨氧化古菌的均衡生长,使其群落结构多样性高于其他处理。关于不同有效磷含量对土壤氨氧化古菌

群落结构和丰度的影响以及原因还需要进一步的研究。

从不同处理的酶切分型结果还可以看出,N 和 CK 处理中出现一类相同 OTU 的优势菌群,而其他处理间无相同 OTU 的菌群。可能由于土壤中氨氧化古菌在长期施肥制度下出现种群迁移现象。He等^[18]和 Ying等^[24]均发现长期施肥导致酸性红壤氨氧化古菌呈现出种群迁移现象。

目前,按照 *amoA* 基因序列将氨氧化古菌分为 Cluster S 和 Cluster M 等两大类,前者主要分布在陆地土壤/淡水沉积物环境中,后者主要存在于海洋/海底沉积物中^[17]。根据氨氧化古菌 *amoA* 基因序列构建的系统发育树看出,不同处理土壤中优势氨氧化古菌绝大多数序列隶属于土壤/淡水沉积物分支,极少数序列隶属于海洋/沉积物分支。优势氨氧化古菌 *amoA* 基因序列全部属于土壤环境硝化古菌群落和海洋环境硝化古菌群落,未发现嗜高温环境硝化古菌群落^[25]。土壤中大量氨氧化古菌的存在,可能对土壤的氮素循环起着至关重要的作用。系统发育树结果表明长期施用氮肥和磷肥未导致供试土壤中氨氧化古菌群落结构在分类上的变化。

4 结论

对黄土旱塬长期不同施肥处理碱性黑垆土的研究结果显示,长期不同施肥方式显著影响了土壤中氨氧化古菌的群落多样性。

(1)不同施肥处理土壤中氨氧化古菌的群落指数变化显著。LD 处理 OTU 最多,NP 处理最低,文库能够较好的代表土壤中氨氧化古菌 *amoA* 基因的群落多样性。多样性指数 H' 和优势度指数 D_s 变化趋势基本相同,种群丰富度和均匀度指数在不同处理间变化较大。

(2)不同施肥方式的长期定位试验土壤中优势氨氧化古菌系统进化定位没有显著变化。各处理优势氨氧化古菌绝大部分属于 Cluster S,少数属于 Cluster M,获得的序列全部属于难培养泉古菌门。

参考文献:

- [1] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55(1):485-529.
- [2] Schleper C, Jurgens G, Jonuscheit M. Genomic studies of uncultivated archaea[J]. *Nature Review Microbiology*, 2005, 3(6):479-488.
- [3] 刘晶静, 吴伟祥, 丁颖, 等. 氨氧化古菌及其在氮循环中的重要作

- 用[J]. 应用生态学报, 2010, 21(8):2154-2160.
- LIU Jing-jing, WU Wei-xiang, DING Ying, et al. Ammonia-oxidizing archaea and their important roles in nitrogen biogeochemical cycling: A review[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(8):2154-2160.
- [4] Könneke M, Bernhard A E, de la Torre J R, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon[J]. *Nature*, 2005, 437(22):543-546.
- [5] Treusch A H, Leininger S, Kletzin A, et al. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(12):1985-1995.
- [6] Leininger S, Urlich T, Schlöter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. *Nature*, 2006, 442(17):806-809.
- [7] Yamamoto N, Otawa K, Nakai Y. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea during cattle manure composting[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(4):807-815.
- [8] 熊明彪, 宋光煜, 曹叔尤. 长期施肥的土壤生态效应 [J]. 中国水土保持, 2005(3):24-26.
- XIONG Ming-biao, SONG Guang-yu, CAO Shu-you. Soil ecological effects of long-term fertilization[J]. *Soil and Water Conservation in China*, 2005(3):24-26.
- [9] Di H J, Cameron K C, Shen J P, et al. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72(3):386-394.
- [10] Wang S Y, Wang Y, Feng X J, et al. Quantitative analyses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of four nitrogen-rich wetlands in China[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2011, 90(2):779-787.
- [11] Mao Y, Yannarell A C, Mackie R I. Changes in N-transforming archaea and bacteria in soil during the establishment of bioenergy crops [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e24750.
- [12] Yao H, Gao Y, Nicol G W, et al. Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(13):4618-4625.
- [13] Wertz S, Leigh A K, Grayston S J. Effects of long-term fertilization of forest soils on potential nitrification and on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2011, DOI:10.1111/j.1574-6941.2011.01204.x
- [14] 程林, 刘桂婷, 王保莉, 等. 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[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(7):1333-1340.
- CHEN Lin, LIU Gui-ting, WANG Bao-li, et al. Effects of long-term fertilization on diversity and composition of ammonia-oxidizing bacterium communities in weibei dry-land [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(7):1333-1340.
- [15] 刘桂婷, 程林, 王保莉, 等. 长期不同施肥对黄土旱塬黑垆土氨氧化细菌多样性的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(13):2706-2714.
- LIU Gui-ting, CHEN Lin, WANG Bao-li, et al. Changes of soil ammonia-oxidizing bacterial diversity in response to long-term fertilization in dry highland of loess plateau [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(13):2706-2714.
- [16] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2):316-322.
- [17] Dang H, Li J, Zhang X, et al. Diversity and spatial distribution of amoA-encoding archaea in the deep-sea sediments of the tropical west pacific continental margin[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(5):1482-1493.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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(11):2966-2978.
- [21] Herfort L, Schouten S, Abbas B, et al. Variations in spatial and temporal distribution of Archaea in the North Sea in relation to environmental variables[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 62(3):242-257.
- [22] Beman J M, Popp B N, Francis C A. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California[J]. *The ISME Journal*, 2008, 2(4):429-441.
- [23] Sahan E, Muyzer G. Diversity and spatio-temporal distribution of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in sediments of the Westerschelde estuary[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64(2):175-186.
- [24] Ying J Y, Zhang L M, He J Z. Putative ammonia-oxidizing bacteria and archaea in an acidic red soil with different land utilization patterns[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(2):304-312.
- [25] Prosser J I, Nicol G W. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11):2931-2941.

致谢:感谢中国科学院长武农业生态站提供长期定位施肥试验土壤样品和刘文兆研究员及刘永刚老师的帮助。