

呼伦贝尔沙地不同植被恢复模式土壤 氨氧化细菌群落结构及多样性

李 刚, 修伟明, 王 杰, 于雯超, 吴元凤, 赵建宁, 宋晓龙, 杨殿林*

(农业部产地环境质量重点实验室, 农业部环境保护科研监测所, 天津 300191)

摘 要:采用 PCR-DGGE 技术和克隆测序分析方法, 对不同植被恢复模式下呼伦贝尔沙地土壤氨氧化细菌群落结构、多样性及与土壤理化因子的相关性进行探讨。结果表明, 5 种植被恢复模式土壤氨氧化细菌 16S rRNA 基因 Shannon 指数均显著高于对照(裸地), 其中柠条(*Caragana korshinskii*)+冰草(*Agropyron cristatum*)(AC)模式下 Shannon 指数最高, 其他依次为单播柠条(UC)、单播冰草(UA)、柠条+羊柴(*Hedysarum fruticosum*)+冰草+披碱草(*Elymus nutans*)(ACHE)和单播羊柴(UH), 各植被恢复模式不同程度地提高了土壤氨氧化细菌的多样性。系统发育分析结果表明, 对照(裸地)土壤氨氧化细菌群落由亚硝化螺菌属的 Cluster 2 和 Cluster 3 组成, 而 5 种植被恢复模式土壤氨氧化细菌群落由亚硝化螺菌属的 Cluster 3 和亚硝化单胞菌属的 Cluster 6 组成, 植被恢复改变了土壤氨氧化细菌群落结构组成。土壤理化性质测定结果表明, 5 种植被恢复模式在不同程度上提高了土壤各项理化指标。典范对应分析结果表明, pH 值、有机质(OM)、全氮(TN)、全磷(TP)和土壤含水量(SM)对氨氧化细菌群落结构组成的影响均达到显著水平($P<0.05$), 相关性分析发现 pH 值、OM、TN、TP 和 SM 各指标之间均具有极显著相关性($P<0.01$), 说明植被恢复过程中土壤氨氧化细菌群落结构组成的变化是土壤各项理化因子相互关联、共同作用的结果。

关键词:呼伦贝尔沙地; 植被恢复; 氨氧化细菌; DGGE; 群落结构

中图分类号: S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2014)01-0111-10 doi:10.11654/jaes.2014.01.014

Community Structure and Diversity of Soil Ammonia-oxidizing Bacteria Under Different Vegetation Restoration Patterns in Hulunbeier Sandy Land, Inner Mongolia, China

LI Gang, XIU Wei-ming, WANG jie, YU Wen-chao, WU Yuan-feng, ZHAO Jian-ning, SONG Xiao-long, YANG Dian-lin*

(Key Laboratory of Original Agro-environment Quality of Ministry of Agriculture, Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China)

Abstract: Grassland desertification seriously threatens economic and social sustainable developments. How to control grassland desertification, and even to restore and reconstruct grassland has been paid much attention to. Vegetation restoration is considered to be a very effective solution. Nitrogen cycling plays important role in the vegetation restoration process. Microbial ammonia oxidation is the first and often rate-limiting step of nitrification, a fundamental process in nitrogen cycling. It is, therefore, important to understand the relationship between vegetation and the community structure and diversity of soil ammonia-oxidizing bacteria during the restoration process. Here we investigated the 16S rRNA gene diversity, phylogeny of soil ammonia-oxidizing bacteria and their correlations with the soil physical and chemical factors in Hulunbeier sandy land of Inner Mongolia under five vegetation restoration patterns, i. e., mixed-planting of *Agropyron cristatum*, *Hedysarum fruticosum*, *Caragana korshinskii*, and *Elymus nutans* (ACHE) and of *Agropyron cristatum* and *Hedysarum fruticosum* (AC), and mono-planting of *Caragana korshinskii* (UC), *Agropyron cristatum* (UA), and *Hedysarum fruticosum* (UH) with bare land as the control (CK) using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), cloning and sequencing analysis. The results indicated that the Shannon index of the 16S rRNA gene was the highest under AC, followed by UC, UA, ACHE and UH. The five

收稿日期: 2013-07-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000242, 31170435 和 31200424)资助

作者简介: 李 刚(1981—), 男, 汉族, 辽宁辽阳人, 硕士, 助理研究员, 主要从事土壤微生物生态学研究。E-mail: gangli1981@gmail.com

* 通信作者: 杨殿林 E-mail: yangdianlin@caas.cn

vegetation restoration patterns all had a significantly higher Shannon indexes than CK ($P < 0.05$). The phylogenetic analysis showed that the soil ammonia-oxidizing bacteria under CK were mainly the Cluster 2 and Cluster 3 of *Nitrosospira*. But the composition of soil ammonia-oxidizing bacteria under the five vegetation restoration patterns had undergone significant changes compared to CK, composed of Cluster 3 of *Nitrosospira* and Cluster 6 of *Nitrosomonas*. Five vegetation restoration patterns improved soil physical and chemical properties in varying degrees. Canonical correspondence analysis showed that soil ammonia-oxidizing bacterial community structure was significantly ($P < 0.05$) influenced by soil pH, soil moisture, total nitrogen, organic matter and total phosphorus. Significant correlation ($P < 0.01$) was found between pH, soil moisture, total nitrogen, organic matter and total phosphorus. These findings indicate that soil ammonia-oxidizing bacterial communities was dependent on the combined effects of the various physico-chemical factors.

Keywords: Hulunbeier sandy land; vegetation restoration; ammonia-oxidizing bacteria; DGGE; community structure

土壤氮循环是陆地生态系统中物质能量循环的重要组成部分,主要包括固氮作用、硝化作用、反硝化作用和氨化作用,均由微生物驱动实现^[1]。硝化作用作为氮素循环的关键环节,由氨氧化作用和亚硝化作用两个过程组成^[2]。氨氧化作用是硝化作用的第一个反应步骤,也是限速步骤,是全球氮循环的中心环节^[3],氨氧化细菌(ammonia oxidizing bacteria, AOB)则是执行这一限速步骤的关键微生物之一,其群落多样性变化对土壤氮素转化具有重要意义^[4]。因此,在微生物生态研究中氨氧化细菌受到了广泛关注^[5-7]。

呼伦贝尔草原是世界草地资源和生物多样性资源的重要基地,但由于受到全球气候变化、长期过度利用等多种因素的影响,其生态系统受到严重破坏,土壤沙化日趋严重。沙漠化成为呼伦贝尔草原亟待解决的环境问题,已威胁到我国经济社会的可持续发展^[8],沙地治理刻不容缓,其根本解决途径需要依靠科学的植被恢复和重建技术^[9]。目前,对沙地的研究主要关注的是植被恢复模式的设计,以及植被恢复后地表植物群落结构和土壤理化性质等方面的变化特征^[10-11],但有关不同植被恢复模式对沙地土壤养分转化密切相关的氨氧化微生物群落结构组成的影响未见相关报道。本研究旨在利用 PCR-DGGE 技术及扩增产物序列分析方法研究呼伦贝尔沙地不同植被恢复模式下土壤氨氧化细菌群落结构组成和多样性变化,深入分析不同植被恢复模式下土壤质量的改变状况,探讨氨氧化细菌结构组成和多样性对沙地植被恢复模式和环境因子响应的微生物生态学过程,为呼伦贝尔沙地植被恢复、重建和生态系统的可持续发展提供理论依据和技术支撑。

1 研究地区与研究方法

1.1 研究区概况

研究区地处内蒙古呼伦贝尔市陈巴尔虎旗(49°12'N,

118°54'E),草原退化、沙化现象显著,为我国呼伦贝尔地区沙地典型代表。该区海拔 618.0 m,属中温带半湿润和半干旱大陆性气候,年平均气温 -2.6 °C,年平均降水量 307.7 mm,年蒸发量 1371.1 mm,年均风速 $3.5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$,全年 8 级以上大风日平均天数 24.8 d。沙地周围主要自然植被类型为大针茅(*Stipa grandis*)和羊草(*Leymus chinensis*),沙地土壤类型为沙质栗钙土。

1.2 样地设置和土壤样品采集

1.2.1 样地设置

本研究选择冰草(*Agropyron cristatum*)、羊柴(*He-dysarum fruticosum*)、柠条(*Caragana korshinskii*)和披碱草(*Elymus nutans*)4种经过多年种植证明具备良好的水土保持和固沙能力的植物用于沙地植被恢复试验。试验始于 2006 年 7 月,分别设单播冰草(UA)、单播羊柴(UH)、单播柠条(UC)、柠条+冰草混播(AC)、柠条+冰草+羊柴+披碱草混播(ACHE)5种植被恢复模式,以完全退化的沙地为对照(CK)。小区面积 1 hm^2 ,各 3 次重复,随机区组分布。采用条播方式,其中 UA 模式播种量为 $3.75 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$,UH 模式为 $4.5 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$,UC、AC 和 ACHE 模式均为 $5.25 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$,播种深度为 3~4 cm。

1.2.2 土壤样品采集

于 2010 年 7 月 30 日,在 6 个处理的小区中采集土壤样品。采用 S 形 20 点取样法采样,垂直取 0~10 cm 深度的土壤,将所采集同一处理不同小区土样混匀,除去石块、植物根茬等杂物,采用“四分法”选取 1 kg 土样装入无菌袋内,置于冷藏采样箱中带回实验室。将土样分为 2 份,其中一份用于理化性质测定,另一份于 -70 °C 冰箱中冻存。

1.3 分析方法

1.3.1 土壤理化性质测定

土壤有机质、全氮、硝态氮、铵态氮、全磷、速效磷、水分含量和 pH 值的测定参照鲍士旦^[12]的方法。有

机质、全氮、硝态氮、铵态氮、全磷、速效磷和水分含量的测定结果见李刚等的研究结果^[13]。pH 值测定结果见表 1。

1.3.2 土壤样品 DNA 提取

采用 PowerSoil[®] DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Solana Beach, CA, USA) 方法按照操作说明从 0.5 g 土壤样品中提取总 DNA, 每个处理 3 次重复。采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测土壤 DNA 样品质量。

1.3.3 PCR 扩增

本研究针对广泛存在于土壤环境中的 β -变形菌门氨氧化细菌,采用巢式 PCR(nested PCR)方法扩增其 16S rRNA 基因序列^[14],引物及反应条件见表 2。第一轮 PCR 反应产物大小为 465 bp,50 μ L 的反应体系中含有 1 倍 10 $\times$ Ex Buffer、400 μ mol $\cdot$ L⁻¹ dNTPs、0.5 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 的每种引物、1.25 U 的 Ex Taq 聚合酶(TaKaRa)、50 ng 的模板 DNA。第二轮 PCR 反应产物大小为 234 bp,50 μ L 的反应体系中含有 1 $\times$ Buffer、400 μ mol $\cdot$ L⁻¹ dNTPs、0.5 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 的每种引物、1.25 U 的 Ex Taq 聚合酶(TaKaRa),以 2 μ L 第一轮 PCR 产物作为模板。

1.3.4 变性梯度凝胶电泳

DGGE 采用 Dcode™ 通用突变检测系统(Bio-Rad, USA)进行。聚丙烯酰胺凝胶(37.5:1)浓度为 8%,变性剂梯度为 40%~60%[100%变性剂含有 7 mol·L⁻¹ 尿素和 40%(V/V)去离子甲酰胺]。每个胶孔中加入 25 μL PCR 产物(与 loading buffer 预混好),在 200 V、60 ℃ 条件下电泳 6.5 h。电泳结束后,SYBR™ Green I(1:10 000)(Invitrogen)染色 25 min,用 Gel Dox XR 凝胶成像系统(Bio-Rad, USA)观察并拍照。根据 DGGE 图

谱,选取主要条带割胶回收,试验共回收 36 条 DGGE 条带。

1.3.5 DGGE 条带测序和系统发育分析

用不带 GC 夹的 341f 和 534r 引物扩增割胶回收的 DGGE 条带。PCR 产物经过电泳分析确定为单一条带后采用胶纯化试剂盒 (Promega) 回收。片段连接到 pGEMT-easy Vector (Promega) 上并转化到 *E. coli* JM109 中, 阳性克隆送上海生工生物技术公司进行测序。测序结果在 NCBI 上经 Blast 比对分析, 获得相近典型菌株序列。用 Mega 5.2.1 中的邻接法 (Neighbor-Joining) 建立氨氧化细菌 16S rRNA 基因的系统发育树。

1.4 数据处理

DGGE 图谱采用 Quantity One 软件(Bio-Rad, USA) 进行数字化处理, 并进行聚类分析(UPGMA 法)。土壤氨氧化细菌 16S rRNA 基因多样性采用 Shannon 指数和均匀度来评价, 计算公式如下:

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

$$EH=H/\Lambda_n S$$

式中: H 为 Shannon 指数; EH 为均匀度指数; S 为 DGGE 胶中条带数目; P_i 为第 i 条带灰度占该样品总灰度的比率。

采用 SPSS 16.0 进行方差分析(ANOVA)和相关分析。采用 Canoco 4.5.1 软件对环境因子进行典范对应分析(Canonical Correspondence Analysis, CCA)。

2 结果与分析

2.1 土壤氨氧化细菌 16S rRNA 基因 DGGE 图谱分析

表 1 不同植被恢复模式土壤 pH 值测定结果

Table 1 Soil pH under different vegetation restoration patterns

处理 Treatment	CK	UA	UH	UC	AC	ACHE
pH	5.82±0.02a	6.46±0.04c	6.28±0.03b	6.73±0.03d	6.95±0.04e	7.23±0.03f

注:同一行中不同的字母表示差异达到显著水平($P<0.05$)。

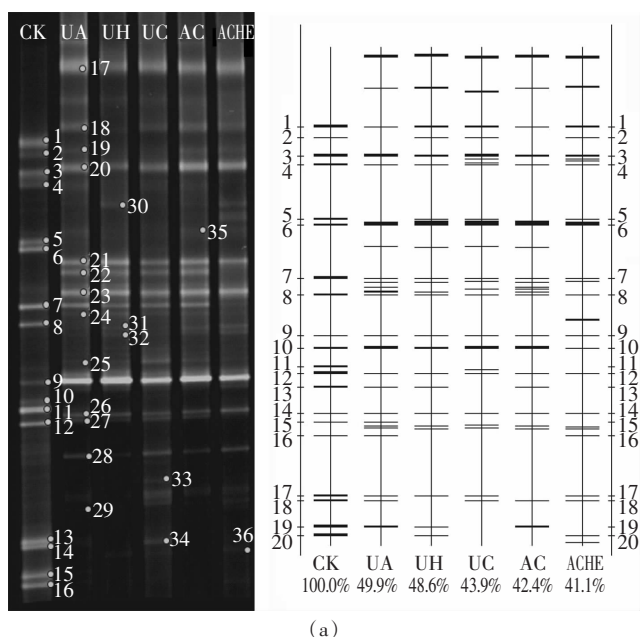
Note: Means followed by different letters indicate significant differences at $P<0.05$.

表 2 聚合酶链式反应中的引物及反应条件

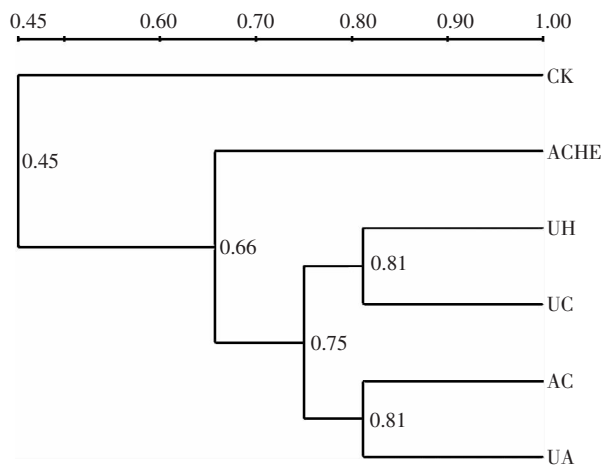
Table 2 Primers and PCR conditions used for the PCR amplification

巢式 PCR Nested PCR	引物名称 Primer	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	反应条件 Reaction condition
第一轮反应 Step 1	CTO189fab ^[15] CTO654r	GGAGRAAAGCAGGGGATCG CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC	95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 57 ℃ 1 min, 72 ℃ 45 s, 35 个循环; 72 ℃ 5 min
第二轮反应 Step 2	341f- GC * ^[16] 534r	CCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTCG	94 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min, 65 ℃ 1 min(每个循环降低 0.5 ℃), 72 ℃ 1 min, 20 个循环; 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 10 个循环; 72 ℃ 7 min

注: R = A/G; Y = C/T. *GC 夹子 GC clamp: CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGGCCCGCCGCCCCCGCCCC.



(a)



(b)

CK:对照 Control;UA:单播冰草 *Unicast A. cristatum*;UH:单播羊柴 *Unicast H. fruticosum*;UC:单播柠条 *Unicast C. korshinskii*;AC:冰草+柠条 *A. cristatum + C. korshinskii*;ACHE:冰草+柠条+羊柴+披碱草, *A. cristatum + C. korshinskii + H. fruticosum + E. nutans*.

1~36:条带编号 Band No. 下同 The same below

图1 土壤氨氧化细菌 16S rRNA 基因 PCR-DGGE

电泳图谱(a)和聚类分析(b)

Figure 1 PCR-DGGE fingerprinting(a) and cluster analysis (UPGMA)(b) of soil ammonia-oxidizing bacterial 16S rRNA gene

明,5种植被恢复模式下土壤氨氧化细菌 DGGE 图谱谱形较对照(裸地)差异显著,而5种植被恢复模式之间谱形相似。聚类分析(UPGMA)进一步证明此结果(图1-b),CK和5种不同植被恢复模式土壤氨氧化细菌 16S rRNA 基因可聚为两大类:AC与UA聚在一起,相似性为81%,UC与UH聚在一起,相似性也为81%,最后再与ACHE聚在一起成为一类,相似度达

到66%;另一类为CK,与其他5种植被恢复模式的相似性仅为45%。一般相似性高于60%的两个群体具有较好的相似性^[17],由此也说明5种植被恢复模式土壤氨氧化细菌群落结构组成具有较高的相似性。由图1-a还可以看出,条带1至16中除条带7和9外,均为CK所特有,说明对照(裸地)具有独特的氨氧化细菌群落结构,而条带7和9在CK和5种植被恢复模式中均出现,说明在植被恢复过程中此种氨氧化细菌种类并没有消失。条带17、18、20、21、23、24、25、26、28、31和32为5种植被恢复模式所共有,说明在不同植被恢复模式恢复过程中形成比较稳定的氨氧化细菌结构组成,而其他特异条带(如条带30和33)的出现,说明在不同植被模式恢复的过程中,衍生出独特的氨氧化细菌种类。

2.2 土壤氨氧化细菌 16S rRNA 基因多样性分析

根据电泳图谱中每条条带的灰度比率,对5种植被恢复模式土壤氨氧化细菌 16S rRNA 基因 Shannon 指数(H)和均匀度指数(EH)进行分析。由表3可知,5种植被恢复模式 Shannon 指数均显著高于对照(裸地),其中AC模式下土壤氨氧化细菌 16S rRNA 基因 Shannon 指数最高,为2.48,其次是UC、UA、ACHE和UH,分别为2.45、2.45、2.34和2.26,CK仅为2.03。虽然5种植被恢复模式间 Shannon 指数也存在显著差异,但由于5种植被恢复模式 DGGE 图谱谱形相似,这种显著差异的产生可能是某些种类土壤氨氧化细菌数量发生变化的体现。5种植被恢复模式均匀度指数的变化趋势与 Shannon 指数相似,均显著高于对照(裸地),依次为 $AC > UA > UC > ACHE > UH$ 。

2.3 土壤氨氧化细菌 16S rRNA 基因测序结果及系统发育分析

Blast 比对结果表明(表4),36个阳性克隆与已知序列的相似度较高,在91%~100%之间。氨氧化细菌系统发育树的构建采用 McCaig 等^[18]的方法。从系统发育树可知(图2),所获得的序列均属于 β -变形菌门的亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)的 Cluster 2、Cluster 3 和亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)的 Cluster 6。对照(裸地)土壤氨氧化细菌群落由亚硝化螺菌属的 Cluster 2 和 Cluster 3 组成,以 Cluster 3 为主。而5种植被恢复模式土壤氨氧化细菌群落由亚硝化螺菌属的 Cluster 3 和亚硝化单胞菌属的 Cluster 6 组成,其中 Cluster 3 略占优势,说明5种植被恢复模式土壤氨氧化细菌群落结构组成较对照(裸地)发生了显著变化。同时,本研究未发现隶属于亚硝化螺菌属 Cluster

表 3 5 种植被恢复模式土壤氨氧化细菌 DGGE 图谱条带数、Shannon 指数和均匀度指数

Table 3 The number of DGGE bands, Shannon index and evenness index of soil ammonia-oxidizing bacteria under different vegetation restoration patterns

处理 Treatment	条带数 Band number	Shannon 指数 Shannon index	均匀度指数 Evenness index
CK	19.0±1.0a	2.03±0.02a	0.676±0.005a
UA	25.0±1.0b	2.45±0.02d	0.751±0.005d
UH	25.3±0.6b	2.26±0.01b	0.702±0.003b
UC	27.3±0.6d	2.45±0.02d	0.744±0.007d
AC	27.3±1.5d	2.48±0.01e	0.753±0.003d
ACHE	26.0±1.0bc	2.34±0.02c	0.717±0.005c

1、Cluster 4 和亚硝化单胞菌属 Cluster 5、Cluster 7 的克隆。

2.4 土壤氨氧化细菌 16S rRNA 基因与土壤理化因子的典范对应分析

DGGE 条带灰度比率与土壤理化指标的典范对应分析(CCA)见表 5。前 2 个排序轴合并解释了样本中 80.4%的样本总变异。在该排序图中,第一排序轴中由速效磷(AP)、全磷(TP)、全氮(TN)、硝态氮(NO_3^--N)、有机质(OM)、土壤含水量(SM)、pH 值(负相关)和铵态氮(NH_4^+-N)(正相关)组成。第二排序轴中由速效磷(AP)、全磷(TP)、全氮(TN)、有机质(OM)、土壤含水量(SM)、pH 值(正相关)和硝态氮(NO_3^--N)、铵态氮(NH_4^+-N)(负相关)组成(图 3)。

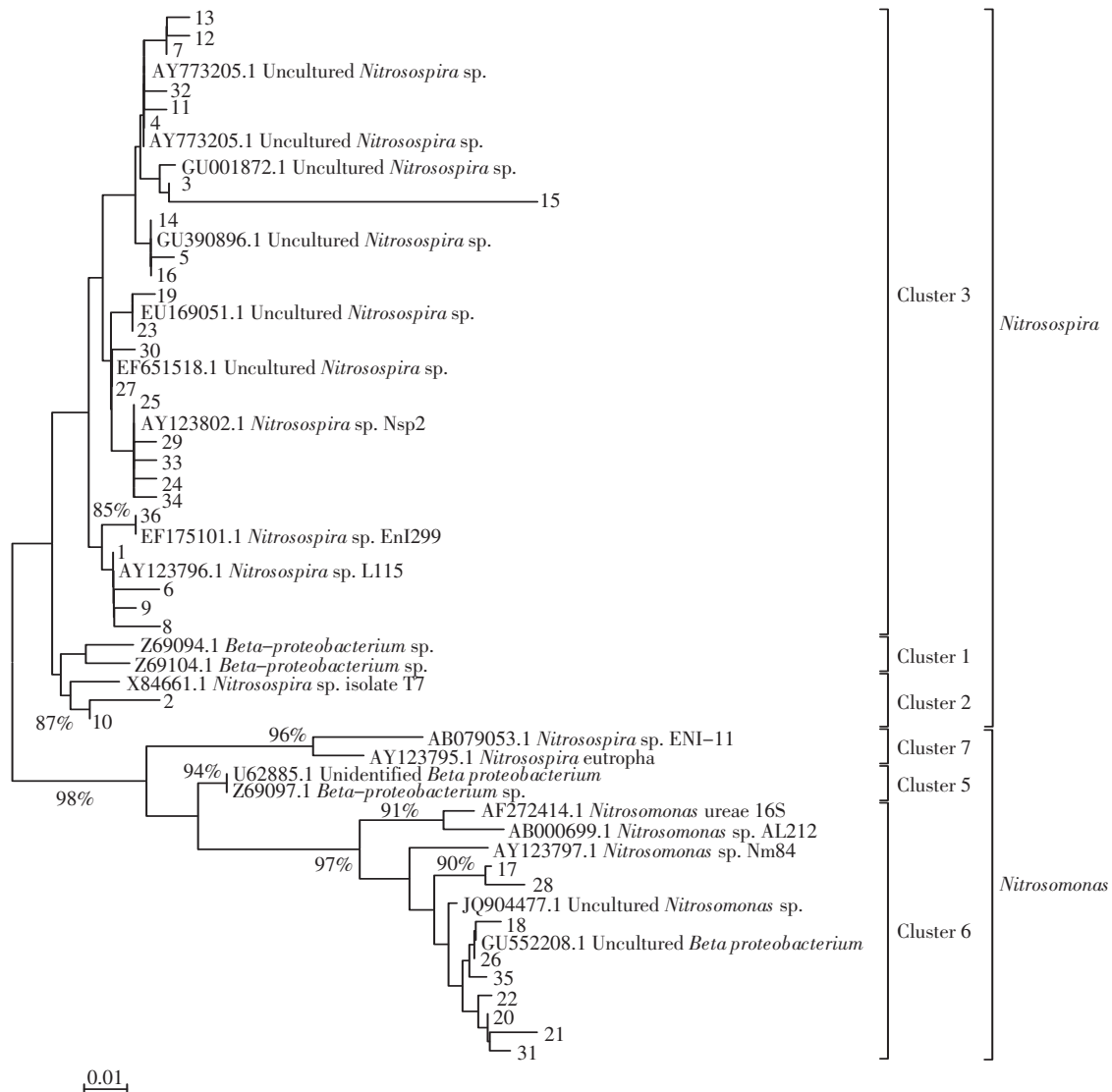


图 2 5 种植被恢复模式土壤氨氧化细菌 16S rRNA 基因系统发育树(邻接法)

Figure 2 Neighbour-joining tree depicting the phylogenetic relationships among the 16S rRNA sequences under five vegetation restoration patterns

表 4 DGGE 条带比对结果
Table 4 BLAST analysis on the sequences of the 16S rRNA/DGGE excised and sequenced bands

条带编号 Band No.	相似度 Similarity/%	GenBank 登录号 GenBank accession number	比对菌 Relative bacterium
1	100%	FN562082.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
2	98%	AB239007.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
3	99%	GU001873.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
4	99%	JX862550.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
5	99%	AB474996.1	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium
6	99%	GU390894.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
7	99%	EU327543.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
8	99%	JQ904489.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
9	99%	GU390895.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
10	99%	AY114348.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
11	99%	EU327539.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
12	99%	EF651360.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
13	99%	FJ792835.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
14	100%	GU390896.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
15	91%	GU001872.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
16	99%	DQ997725.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
17	99%	AJ245755.1	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp.
18	99%	JQ904477.1	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp.
19	99%	EU169051.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
20	100%	JQ370791.2	Uncultured bacterium
21	98%	GU552208.1	Uncultured beta proteobacterium
22	97%	JQ951809.1	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium
23	100%	EU169051.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
24	99%	AF386754.1	<i>Nitrosospira</i> sp. BF16c46
25	100%	FJ446563.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
26	100%	GU552208.1	Uncultured beta proteobacterium
27	100%	EF651594.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
28	98%	JQ726019.1	Uncultured ammonia-oxidizing beta proteobacterium
29	99%	AY123802.1	<i>Nitrosospira</i> sp. Nsp2
30	99%	KC138712.1	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium
31	99%	JQ371655.2	Uncultured bacterium
32	99%	AY773205.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
33	99%	AJ298745.1	<i>Nitrosospira</i> sp. Nsp2
34	99%	EF651518.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.
35	98%	JQ726131.1	Uncultured ammonia-oxidizing beta proteobacterium
36	99%	JQ904485.1	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.

表 5 典范对应性分析结果
Table 5 Summary of canonical correspondence analysis

项目 Items	第一轴 Axes1	第二轴 Axes2	第三轴 Axes3	第四轴 Axes4
特征值 Eigen values	0.807	0.154	0.069	0.043
种-环境相关系数 Species-environment correlations	0.978	0.990	0.918	0.799
种累积百分比变化率 Cumulative percentage variance of species data	67.5	80.4	86.2	89.8
种-环境累积百分比变化率 Cumulative percentage variance of species-environment relation	72.5	86.3	92.5	96.4

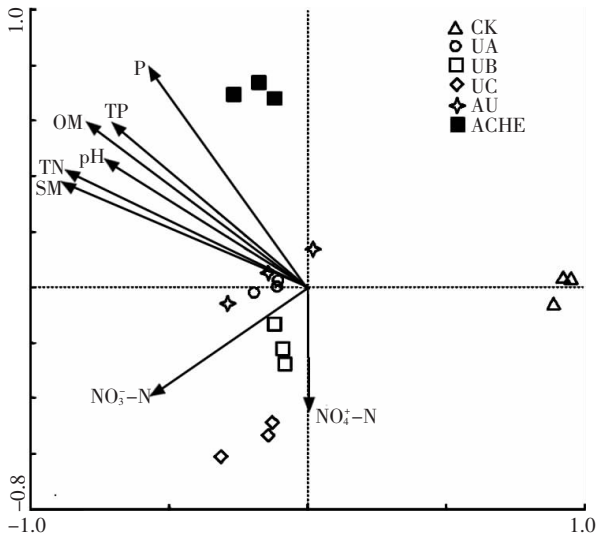


图3 土壤理化因子与氨氧化细菌群落结构组成的 CCA 分析

Figure 3 Canonical correspondence analysis (CCA) of soil physico-chemical factors and ammonia-oxidizing bacterial community structure and composition

各个处理的土质状况以有机质(OM)、全氮(TN)、硝态氮(NO_3^- -N)、铵态氮(NH_4^+ -N)、全磷(TP)、速效磷(AP)、土壤含水量(SM)和 pH 值共 8 项理化指标来表征。经蒙特卡洛检验(Monte Carlo permutation test)结果表明,SM($P:0.0020$)、pH 值($P:0.0020$)、TN($P:0.0040$)、OM($P:0.0060$)和 TP($P:0.0220$)可以解释氨氧化细菌的种群变化,具有 95% 以上的置信度。第一排序轴将 ACHE 与 UH 和 UC 分开,CK、UA 和 AC 未分离,第二排序轴将 CK 与 ACHE、UA、UH 和 UC 分开,AC 未分离。对具有显著影响的各理化因子之间进行相关分析的结果发现,pH 值、OM、TN、TP 和 SM 各指标之间均具有极显著相关性($P<0.01$),说明不同植被恢复模式土壤氨氧化细菌的群落结构组成受上述各项土壤理化因子的共同影响。

3 讨论

土壤硝化作用是氮素生物地球化学循环的重要环节之一,氨氧化细菌作为执行硝化作用中氨氧化过程的重要成员和理想的微生物生态学研究的模式微生物,其群落结构组成对陆地生态系统中环境因子的变化具有潜在的指示作用^[7,19]。本研究采用了 PCR-DGGE 技术和克隆测序方法,首次对呼伦贝尔沙地不同植被恢复模式土壤氨氧化细菌 16S rRNA 基因多样性及群落结构组成进行了比较分析,探讨了氨氧化细菌 16S rRNA 基因多样性变化对不同植被恢复模式的响应。

研究发现,与对照(裸地)相比,5 种植被恢复模式土壤氨氧化细菌 DGGE 谱形发生显著变化,说明植被恢复改变了土壤氨氧化细菌群落结构。而 5 种植被恢复模式间谱形差异较小,且大部分条带均为 5 种植物模式所共有,虽然有特异条带出现,但这些条带也不仅仅为某一植被恢复模式所特有,说明在不同植被恢复模式恢复过程中可能形成了较为稳定的氨氧化细菌群落结构。本研究发现不同植被恢复模式下土壤固氮细菌 *nifH* 基因^[13]和反硝化细菌 *nirK*、*nirS* 基因(另文报道)的 DGGE 谱形不仅较对照(裸地)差异明显,而且不同恢复模式之间谱形同样存在显著差异。这说明植被恢复过程中,土壤氨氧化细菌、固氮细菌和反硝化细菌对植被恢复过程产生了不同的响应,而这种响应产生的机制有待进一步研究。

植物、土壤和微生物之间形成紧密的相互关系,植被的出现改善了土壤状况,同时促进了土壤微生物的生长^[20]。本研究发现,植被恢复模式不同程度地改变了土壤理化性质,与对照(裸地)相比,除铵态氮和硝态氮个别模式差异不显著外,有机质、全氮、全磷等理化性质差异均达到显著水平。这说明沙地上种植植被后,土壤性质明显改善,同时微生物对此变化作出了响应。Shannon 指数(H)和均匀度指数(EH)的分析结果说明这一点,5 种植被恢复模式土壤氨氧化细菌多样性均显著高于对照(裸地),在植被恢复过程中,土壤氨氧化细菌多样性明显增加。植物物种多样性对草原土壤生化过程产生重要影响^[21],土壤微生物作为土壤生化过程的重要驱动者,与地表植物建立了紧密的联系。本实验研究发现不同植被恢复模式下除所播植物种类外出现了新的植物,植物物种数量均有所增加,其中冰草和柠条混播模式下植物种类最多,且此模式又具有最高的氨氧化细菌多样性指数,然而 4 种植物恢复模式(ACHE)下土壤氨氧化细菌多样性指数却低于 UC 和 UA 模式,而 4 种植物混播时所有植被指示指标均处于 5 种植物恢复模式的第二位(结果未列出),说明氨氧化细菌的多样性与植物种类数目之间存在一定的相关性,但并不是完全相关。这与 Zhang 等^[22]发现土壤微生物功能多样性与植物种类数目之间并不是完全相关以及 Rodriguez-Loinaz 等^[23]发现在天然林土壤中几种酶活性和植物多样性之间既有正相关又有负相关相符合。这些植被生长状况、地表覆盖程度、根系分泌物的化学组成及根系周转速率均存在差异^[24],造成土壤养分含量发生变化,进而导致土壤氨氧化细菌多样性的不同。

pH 值是驱动土壤细菌地理分布的重要因素^[25], 作为细菌的重要组成部分, 氨氧化细菌种群直接受到土壤 pH 值变化的影响^[29]。本研究发现, 不同植被恢复模式下土壤 pH 值均显著高于对照(裸地), 其中ACHE 模式下土壤 pH 值最高, 其次为 AC 模式, 这两种混播模式下土壤均呈中性, 而 3 种单播模式土壤 pH 值均低于混播模式, 呈弱酸性。有研究发现, 氨氧化细菌适宜生长的酸度范围为 pH 值 7.0~8.5^[26], 虽然可以解释 AC 模式下土壤氨氧化细菌具有最高的多样性, 但这并不是绝对的, 因为 ACHE 模式具有最高的土壤 pH 值, 但并不具有最高的多样性。这也说明土壤氨氧化细菌的活性会受到不同的生态环境因子的共同影响。通过典范对应分析发现, pH 值、SM、TN、OM 和 TP 对土壤氨氧化细菌区系的影响均达到显著水平 ($P < 0.05$), 同时这 5 项理化指标之间均具有极显著相关性 ($P < 0.01$), 说明不同植被恢复模式多种土壤理化因子之间相互关联共同影响氨氧化细菌的群落结构组成。这支持 Marschner 等^[27]的观点, 草原生态系统的微生物群落结构并不是受控于其中一个环境因素, 而是由几个相互联系的环境因子所控制。

从系统发育分析结果可知(图 2), 对照(裸地)土壤氨氧化细菌群落由亚硝化螺菌属的 Cluster 2 和 Cluster 3 组成, 以 Cluster 3 为主。而 5 种植被恢复模式土壤氨氧化细菌群落由亚硝化螺菌属的 Cluster 3 和亚硝化单胞菌属的 Cluster 6 组成, 其中 Cluster 3 略占优势。在植被恢复过程中, Cluster 3 氨氧化细菌在沙地土壤氨氧化细菌群落结构组成中所占比例的降低, 以及 Cluster 2 氨氧化细菌的消失和 Cluster 6 氨氧化细菌的产生, 均说明不同植被恢复模式土壤氨氧化细菌群落结构组成较对照(裸地)发生了显著变化。这种结构组成的变化与土壤 pH 值的变化具有相关性。Kowalchuk 等^[15]认为酸性和碱性土壤中氨氧化细菌具有不同的群落结构组成, 其中酸性土壤中存在亚硝化螺菌属的 Cluster 2 类氨氧化细菌。本研究则发现, 对照(裸地)的 pH 值小于 6.0, 显著低于 5 种植被恢复模式, 而在 5 种植被恢复模式土壤中并未发现 Cluster 2 氨氧化细菌, 很可能是因为植被恢复提高了土壤 pH 值, 导致 Cluster 2 氨氧化细菌的消失。同时, 5 种植被恢复模式间 DGGE 谱形相似, 为了确定这是否说明在 5 种同植被恢复模式过程中所形成的土壤 pH 值范围内氨氧化细菌的群落结构不会发生显著变化, 还需要对这种现象的产生原因进行长期的试验研究。与其他对土壤环境中氨氧化细菌 16S rRNA 基因

多样性的研究^[28-31]比较发现, 本研究中对照(裸地)和 5 种植被恢复模式下土壤氨氧化细菌仅发现亚硝化螺菌属的 Cluster 2、Cluster 3 和亚硝化单胞菌属的 Cluster 6, 且对照(裸地)和 5 种植被恢复模式土壤中各仅存在 2 类氨氧化细菌。这说明植被恢复过程中沙地土壤氨氧化细菌的种类数量低于草原和农田土壤, 沙地的植被恢复是一个长期过程。

本研究首次对呼伦贝尔沙地不同植被恢复模式土壤氨氧化细菌群落结构组成及多样性进行了比较分析, 为沙地植被恢复提供了理论依据和技术支撑。为了进一步揭示呼伦贝尔沙地植被恢复过程中氨氧化细菌群落组成变化, 需要结合多种分子生物学技术手段, 在 DNA 和 RNA 水平上对土壤氨氧化细菌群落结构和数量变化等进行分析。同时, 随着氨氧化古菌的发现以及其在氨氧化过程中发挥的重要作用逐渐为科学界所重视^[32], 科研人员从氨氧化古菌丰度和多样性角度开展了大量的研究^[33-35]。因此, 今后要从氨氧化古菌和氨氧化细菌两个方面开展长期研究, 全面掌握沙地植被恢复过程中氨氧化微生物的群落动态变化对植被恢复的响应机制。

4 结论

(1) 5 种植被恢复模式与对照(裸地)间氨氧化细菌 DGGE 图谱谱形差异显著, 而 5 种植被恢复模式间差异较小, 不同植被恢复模式在恢复过程中形成了较为稳定的氨氧化细菌群落结构。

(2) 对照(裸地)土壤氨氧化细菌群落由亚硝化螺菌属的 Cluster 2 和 Cluster 3 组成, 而 5 种植被恢复模式由亚硝化螺菌属的 Cluster 3 和亚硝化单胞菌属的 Cluster 6 组成, 土壤氨氧化细菌群落结构组成发生了显著变化。

(3) pH 值、有机质(OM)、全氮(TN)、全磷(TP)和土壤含水量(SM)对氨氧化细菌区系的影响均达到显著水平 ($P < 0.05$)。不同植被恢复模式下土壤氨氧化细菌的群落结构组成受 pH 值、有机质(OM)、全氮(TN)、全磷(TP)和土壤含水量(SM)之间相互关联、共同作用的影响。

参考文献:

- [1] Francis C A, Beman J M, Kuypers M M M. New processes and players in the nitrogen cycle: The microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation[J]. *The ISME Journal*, 2007, 1(1): 19-27.
- [2] 董莲华, 杨金水, 袁红莉. 氨氧化细菌的分子生态学研究进展[J]. *应用生态学报*, 2008, 19(6): 1381-1388.

- DONG Lian-hua, YANG Jin-shui, YUAN Hong-li. Research advances in molecular ecology of ammonia oxidizing bacteria[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(6):1381-1388.
- [3] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展[J]. 生态学报, 2009, 29(1):406-415.
- HE Ji-zheng, ZHANG Li-mei. Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(1):406-415.
- [4] 宋亚娜, 苏军, 林艳, 等. 转 cry1Ac/cpti 基因水稻对土壤氨氧化细菌群落组成和丰度的影响[J]. 生物安全学报, 2012, 21(1):67-73.
- SONG Ya-na, SU Jun, LIN Yan, et al. Effect of cry1Ac/cpti transgenic rice on community composition and abundance of ammonia-oxidizing bacteria in paddy soil[J]. *Journal of Biosafety*, 2012, 21(1):67-73.
- [5] Li M, Gu J D. Community structure and transcript responses of anammox bacteria, AOA, and AOB in mangrove sediment microcosms amended with ammonium and nitrite[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013(ahead of print)(DOI:10.1007/s00253-012-4683-y).
- [6] Xu Y G, Yu W T, Ma Q, et al. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidisers of an acidic luvisols soil to different nitrogen fertilization rates after 9 years[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48(7):827-837.
- [7] Shen J P, Zhang L M, Di H J, et al. A review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chinese soils[J]. *Frontiers in microbiology*, 2012, 3:296.
- [8] 马琰. 呼伦贝尔草原沙化综合治理技术模式研究[J]. 科技信息, 2007, 34:653-654.
- MA Yan. Causes and countermeasures of the desertification in Hulunbeier Grassland[J]. *Science and Technology information*, 2007, 34:653-654.
- [9] 李铭, 姜继元, 窦中江, 等. 绿洲与荒漠交错带植被恢复区土壤水分变化研究[J]. 干旱区资源与环境, 2011, 25(2):156-161.
- LI Ming, JIANG Ji-yuan, DOU Zhong-jiang, et al. Research of soil moisture changes for vegetation recovery in ecotone between oasis and desert[J]. *Journal of Arid Land Resources and Environment*, 2011, 25(2):156-161.
- [10] 康冰, 刘世荣, 蔡道雄, 等. 南亚热带不同植被恢复模式下土壤理化性质[J]. 应用生态学报, 2010, 21(10):2479-2486.
- KANG Bing, LIU Shi-rong, CAI Dao-xiong, et al. Soil physical and chemical characteristics under different vegetation restoration patterns in China south subtropical area[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(10):2479-2486.
- [11] 万勤琴, 朴起亨, 丁国栋, 等. 呼伦贝尔沙地草场沙漠化成因分析[J]. 水土保持研究, 2007, 14(4):263-266.
- WAN Qin-qin, PIAO Qi-heng, DING Guo-dong, et al. Analysis on the reason of sandy desertification in Hulunber Steppe[J]. *Research of Soil and Water Conservation*, 2007, 14(4):263-266.
- [12] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第三版. 北京:中国农业出版社, 2008:39-89.
- BAO Shi-dan. Soil and agriculture chemistry analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2005:39-89.
- [13] 李刚, 王丽娟, 李玉洁, 等. 呼伦贝尔沙地不同植被恢复模式对土壤固氮微生物多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2013, 24(6):1639-1646.
- LI Gang, WANG Li-juan, LI Yu-jie, et al. Effects of different vegetation restoration patterns on the diversity of soil nitrogen-fixing microbes in Hulunbeier sandy land, Inner Mongolia of North China[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(6):1639-1646.
- [14] Zhang B, Sun B, Ji M, et al. Quantification and comparison of ammonia-oxidizing bacterial communities in MBRs treating various types of wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101:3054-3059.
- [15] Kowalchuk G A, Stephen J R, De Boer W, et al. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta 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, 63:1489-1497.
- [16] Liu F H, Wang S B, Zhang J S, et al. The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106:952-966.
- [17] 王奇赞, 徐秋芳, 姜培坤, 等. 天目山毛竹入侵阔叶林后土壤细菌群落 16S rDNA V3 区片段 PCR 的 DGGE 分析[J]. 土壤学报, 2009, 46(4):662-669.
- WANG Qi-zan, XU Qiu-fang, JIANG Pei-kun, et al. DGGE analysis of PCR of 16S rDNA V3 fragments of soil bacteria community in soil under natural broadleaf forest invaded by phyllostachy pubescens in pubescens in Tianmu mountain nature reserve[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46(4):662-669.
- [18] Mccaid A E, Phillips C J, Stephen J R, et al. Nitrogen cycling and community structure of proteobacterial subgroup ammonia-oxidizing bacteria within polluted marine fish farm sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65:213-220.
- [19] 王亚男, 曾希柏, 俄胜哲, 等. 施肥对设施菜地氨氧化细菌群落和丰度的影响[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(12):2425-2432.
- WANG Ya-nan, ZENG Xi-bai, E Sheng-zhe, et al. Effects of fertilization treatments on community structure and abundance of ammonia-oxidizing bacteria in greenhouse soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(12):2425-2432.
- [20] Birgit M, Günter B, Muhammad A, et al. Advances in elucidating beneficial interactions between plants, soil, and bacteria[J]. *Advances in Agronomy*, 2013, 121:381-445.
- [21] Medina-Roldán E, Huber-Sannwald E, Arredondo J T. Plant phenotypic functional composition effects on soil processes in a semiarid grassland[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 66:1-9.
- [22] Zhang H F, Li G, Song X L, et al. Changes in soil microbial functional diversity under different vegetation restoration patterns for Hulunbeier Sandy Land[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(1):38-44.
- [23] Rodríguez-Loinaz G, Onaindia M, Amezcua I, et al. Relationship between vegetation diversity and soil functional diversity in native mixed-oak forests[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(1):49-60.
- [24] Sprent J I, Parsons R. Nitrogen fixation in legume and non-legume trees[J]. *Field Crops Research*, 2000, 65(2-3):183-196.

- [25] Shen C C, Xiong J B, Zhang H Y, et al. Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 57:204–211.
- [26] 郝永俊, 吴松维, 吴伟祥, 等. 好氧氨氧化细菌的种群生物学研究进展[J]. *生态学报*, 2007, 27(3):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(3):1573–1582.
- [27] Marschner P, Yang C H, Lieberei R, et al. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(11):1437–1445.
- [28] 文都日乐, 李刚, 杨殿林, 等. 内蒙古呼伦贝尔草原土壤氨氧化细菌多样性及群落结构[J]. *应用生态学报*, 2011, 22(4):929–935.
- WENDU Ri-le, Li Gang, Yang Dian-lin, et al. Diversity and community structure of soil ammonia-oxidizing bacteria in Hulunbeier Grassland, Inner Mongolia[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(4):929–935.
- [29] Ai C, Liang G Q, Sun J W, et al. Different roles of rhizosphere effect and long-term fertilization in the activity and community structure of ammonia oxidizers in a calcareous fluvo-aquic soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 57:30–42.
- [30] Wang Y F, Feng Y Y, Ma X J, et al. Seasonal dynamics of ammonia/ammonium-oxidizing prokaryotes in oxic and anoxic wetland sediments of subtropical coastal mangrove[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2012(Ahead of print)(DOI:10.1007/s00253-012-4510-5).
- [31] 邹雨坤, 张静妮, 陈秀蓉, 等. 三种利用方式对羊草草原土壤氨氧化细菌群落结构的影响[J]. *生态学报*, 2012, 32(10):3118–3127.
- ZOU Yu-kun, ZHANG Jing-ni, CHEN Xiu-rong, et al. Effects of three land use patterns on diversity and community structure of soil ammonia-oxidizing bacteria in *Leymus chinensis* steppe[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(10):3118–3127.
- [32] 武传东, 闫倩, 辛亮, 等. 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[J]. *农业环境科学学报*, 2012, 31(4):743–749.
- WU Chuan-dong, YAN Qian, XIN Liang, et al. Effects of long-term nitrogen and phosphate fertilization on diversity of ammonia-oxidizing archaea in dry highland soil of Loess Plateau, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(4):743–749.
- [33] Placella S A, Firestone M K. Transcriptional response of nitrifying communities to wetting of dry soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79:3294–3302.
- [34] Pett-Ridge J, Petersen D G, Nuccio E, et al. Influence of oxic/anoxic fluctuations on ammonia oxidizers and nitrification potential in a wet tropical soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 185:179–194.
- [35] Mao Y J, Yannarell A C, Davis S C, et al. Impact of different bioenergy crops on N-cycling bacterial and archaeal communities in soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(3):928–942.



国家农业科技园区可持续发展能力研究

本书从国家农业科技园区发展能力的视角出发, 针对国家农业科技园区发展能力建设中的问题, 运用系统论有关原理, 分析了国家农业科技园区这一系统的复杂性, 建立了基于复杂性理论的国家农业科技园区发展能力模型。通过建立和谐性预测模型对国家农业科技园区发展能力做了初步的预测, 对国家农业科技园区发展能力的提升提出了对策和政策框架。

※ 书号: 9787122179227

※ 定价: 85.0 元

※ 开本: 16

※ 出版日期: 2013 年 10 月



城镇净水厂改扩建技术与应用

本书内容可以分为三大部分。主要介绍了饮用水水源的水质现状和水中的主要污染物的性质和危害, 在新的水质标准下常规水处理工艺的局限性和存在问题; 增加预处理工艺、强化常规水处理工艺和完善深度处理工艺三大方面, 详细地阐述了各种改扩建工艺的特点、适用范围和应用效果及前景; 城镇水厂的自动化控制与科学化管理的改进。全书着重介绍了改扩建技术的原理、工程应用效果和前景。

※ 书号: 9787122167668

※ 定价: 58.0 元

※ 开本: 16

※ 出版日期: 2013 年 7 月

如需更多图书信息, 请登录 www.cip.com.cn

服务电话: 010-64518888, 64518800(销售中心)

网上购书可登录化学工业出版社

天猫旗舰店: <http://hxgycbs.tmall.com>

邮购地址: (100011) 北京市东城区青年湖南街 13 号 化学工业出版社

如要出版新著, 请与编辑联系。联系电话: 010-64519525