

淹水水稻土中氨氧化古菌丰度和群落结构演替特征

宋亚珩¹, 王媛媛¹, 李占明¹, 王保莉^{1*}, 曲 东²

(1.西北农林科技大学生命科学院, 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:采用淹水非种植水稻土微环境模式系统, 对水稻土进行 1 h 和 1、5、10、20、30、40、60 d 淹水培养, 利用序列分析和 Real-time PCR 技术分析淹水培养过程中氨氧化古菌(AOA)的丰度和群落结构变化规律。结果表明, 淹水水稻土中细菌(Bac)的丰度是泉古菌(Cre)的 29 倍以上, 而氨氧化古菌(AOA)是氨氧化细菌(AOB)的 4 倍之多, 淹水过程改变了细菌、泉古菌、氨氧化细菌和氨氧化古菌的丰度。基于 *Arch-amoA* 基因的 OTU 分析显示淹水过程中 AOA 的群落结构发生了演替性变化: T12 是 r 策略生存的 AOA, 仅存在于淹水初期; T4、T5 和 T9 是 k 策略生存的 AOA, 存在于淹水后期; T1、T8 和 T16 是 r 和 k-策略共生存的 AOA, 它们存在于整个淹水过程中, 淹水后期 k-策略的 AOA 占据优势。淹水初期优势种群多样性指数大于淹水中、后期, PCA 分析将淹水处理过程分成初期、中期和后期 3 类不同的生境; 测序结果表明, 16 个优势 OTU 类型均属于泉古菌, 且与来自不同地域的水稻土、旱地土、红壤和沉积物氨氧化古菌关系密切。

关键词:淹水水稻土; 氨氧化古菌; 丰度; 群落结构

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2014)05-0999-08 doi:10.11654/jaes.2014.05.025

Succession of Abundance and Community Structure of Ammonia-Oxidizing Archaea in Paddy Soil During Flooding

SONG Ya-heng¹, WANG Yuan-yuan¹, LI Zhan-ming¹, WANG Bao-li^{1*}, QU Dong²

(1.College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 2.College of Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: Ammonia-oxidizing archaea (AOA) play an important role in ammonium oxidation in soil ecosystem, and predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in paddy soils. In this study, dynamic changes of abundance and community structures of ammonia-oxidizing archaea were investigated in paddy soils that were flooded for 1 h, 1 d, 5 d, 10 d, 20 d, 30 d, 40 d and 60 d, using sequential analysis and real-time PCR. The abundance of bacteria was 29 times that of crenarchaeota, while AOA was 4 times ammonia-oxidizing bacteria (AOB). Based-on *arch-amoA* gene, OTU analysis showed that the AOA community structures shifted at different flooding times: T12, a type of AOA and r-strategist organism, was present only at the early flooding time. T4, T5 and T9, k-strategist organisms, existed at the late flooding time. T1, T8 and T16, r-k-strategist symbiotic organisms, appeared during whole flooding period. AOA predominated at the late flooding time. The diversity index of dominant groups was larger at the early flooding than at the middle and late flooding times. Sequencing results showed that all 16 dominant OTU types belonged to crenarchaeota, and had a close relationship with AOA from paddy soil, dry highland soil, red soil and sediments in different regions.

Keywords: paddy soil; ammonia-oxidizing archaea; abundance; community structure

氨氧化作用作为硝化过程的第一步, 是氮素生物地球化学循环的关键步骤^[1]。一百多年来, 人们一直认

为土壤生态系统中的氨氧化作用主要是由变形菌纲中的一些化能自养细菌——氨氧化细菌 (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 催化完成的, 直到 2004 年宏基因组学研究发现海洋古菌基因组中含有类似细菌编码氨单加氧酶的结构基因 *amoA*、*amoB* 和 *amoC*^[2], 2005 年从西雅图水族馆海水中分离培养到第一株氨氧化古菌 (Ammonia-oxidizing archaea, AOA)^[3], 根本

收稿日期: 2013-10-14

基金项目: 国家大学生创新创业训练计划项目 (1210712163); 国家自然科学基金项目 (41171204)

作者简介: 宋亚珩 (1991—), 河南新乡人, 本科生, 专业为生物技术。

E-mail: syh769426@163.com

* 通信作者: 王保莉 E-mail: wbl@nwsuaf.edu.cn

改变了学术界对氨氧化微生物的传统认识。近几年,国际上多个研究小组通过宏基因组学技术和同位素示踪技术相结合的方法,在氨氧化古菌的生态功能特征方面取得了长足发展,研究发现其与氨氧化细菌相比具有不同的生态习性,更适应于极端的寡营养环境^[4]。

Leininger 等^[5]2006 年在“Nature”杂志上报道土壤中氨氧化古菌的数量(以 *amoA* 基因拷贝数计量)是氨氧化细菌的 3000 倍,随后大量的研究发现氨氧化古菌广泛分布于包括海洋、湖泊和土壤等在内的多种环境中,而且其数量通常远远高于氨氧化细菌^[6-7],氨氧化古菌和细菌在硝化作用中的重要性 and 相对贡献也因此成为国际上近年来研究的热点问题。Mao 等^[8]认为土壤硝化速率与氨氧化古菌数量相关性高于其与氨氧化细菌的。宋亚娜等^[9]研究了水稻生育期内红壤稻田氨氧化微生物数量和硝化势的变化,证明了氨氧化微生物尤其是氨氧化古菌在稻田土壤生态系统中占有重要地位。武传东等^[10]对长期施用氮肥和磷肥的渭北旱塬土壤中氨氧化古菌进行群落结构研究,表明长期不同的施肥方式显著影响了土壤中氨氧化古菌的群落多样性。邱昭政等^[11]对河口湿地表层沉积物氨氧化菌的多样性研究表明,溶氧浓度与氨氧化速率呈极显著正相关,与 AOB 多样性指数亦呈显著正相关,与 AOA 群落各指数都无相关关系。周磊榴等^[12]认为低氨氮环境下 AOA 在氨氧化过程中具主导作用。

我国土壤资源丰富,环境条件多样,自 20 世纪 80 年代以来,由于农业氮肥大量投入引起的环境问题日显突出,对硝化作用的研究一直深受重视。水稻土及其稻田系统是环境友好、生态健康、可持续利用的人工湿地生态系统^[13]。稻田土壤氮素的累积、迁移、流失等生物地球化学循环过程是稻田生态系统可持续发展的重要保障之一。植稻土壤中氨氧化古菌和氨氧化细菌的数量明显高于不种植水稻的土壤,其微生物组成也具有明显差异,表明氨氧化古菌是水稻土根际的优势氨氧化微生物,且 AOA 可能比 AOB 更易受水稻土氧气浓度的影响^[14]。水稻生长过程中稻田土壤长期处于淹水状态,可为厌氧氨氧化菌生长提供有利环境,淹水水稻土已经成为研究土壤微生物生态的模式系统^[15]。

鉴于目前国内外对氨氧化古菌在生态学方面和极端条件下的研究较为充分,而关于淹水时间对水稻土中氨氧化古菌的群落结构及丰度影响的研究较少,有必要采用分子生物学的方法分析淹水水稻土中氨氧化古菌的多样性和丰度,以揭示氨氧化古菌在水稻

土淹水条件下的氨氧化作用机制及其群落变化特征,为深入探讨水稻土的氮循环机理提供必要的理论和实验基础。

1 材料和方法

1.1 供试土样

水稻土于 2011 年 10 月采自天津宝坻王卜庄镇后张司马村水稻收获后的稻田。采集 0~20 cm 耕层土壤,风干,磨细,过 1 mm 土壤筛,贮存备用。土壤有机质含量为 $15.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全量氮、磷和钾分别为 2.95、0.580、38.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, pH7.75。

1.2 试验方案

试验设置 8 个不同淹水时间处理,分别为淹水培养 1 h 和 1、5、10、20、30、40、60 d。称取 3.000 g 土样若干份,置于灭菌后的 10 mL 血清瓶中,分别加入无菌去离子水 3 mL,保持水土比为 1:1。加橡胶盖,充氮除氧,用铝盖密封,置于 30 °C 恒温培养箱中避光培养。分别在每个时间点取出 3 份作为重复,置于 -20 °C 保存土壤泥浆样品,待全部培养处理完成后统一提取土壤总 DNA。

1.3 土壤微生物总 DNA 提取

泥浆样品解冻后,采用 OMEGA soil DNA kit 提取土壤微生物总 DNA。

1.4 基于细菌和泉古菌的 16S rRNA 基因的丰度分析

1.4.1 细菌(Bac)的丰度测定

Real-time PCR 体系为: TaKaRa SYBR *Primix Ex Taq*TM II 12.5 μL , Com1 和 Com2 引物各 1 μL , 土壤微生物总 DNA 1 μL , 补加 ddH₂O 至 25 μL 。反应条件见表 1, 扩增片段为 407bp。以含有细菌 16S rRNA 基因的重组 pGEM[®]-T 载体为标准质粒, 计算出标准质粒的拷贝数, 按 10 倍浓度梯度稀释, 以 10^{-1} ~ 10^{-8} 浓度梯度的标准质粒为模板进行荧光定量 PCR 扩增。以标准质粒拷贝数的对数值作为纵坐标, 不同浓度质粒的 *Ct* 值作为横坐标, 建立标准曲线。扩增效率 $E=94.6\%$, $R^2=0.999$ 。

1.4.2 泉古菌(Cre)的丰度测定

Real-time PCR 反应体系为: TaKaRa SYBR *Primix Ex Taq*TM II 12.5 μL , Cre-arch 771F 和 Cre-arch 957R 引物各 1 μL , 土壤微生物总 DNA 1 μL , 补加 ddH₂O 至 25 μL 。反应条件见表 1, 扩增片段为 227bp。以含有古菌 16S rRNA 基因的重组 pGEM[®]-T 载体为标准质粒, 标准曲线建立方法同 1.4.1。 $E=100.9\%$, $R^2=0.998$ 。

1.5 基于 *amoA* 基因的氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)的丰度分析

Real-time PCR 体系:分别取 *amoA*-1F/*amoA*-2R 和 *Arch-amoA*F/*Arch-amoA*R 引物对各 1.0 μ L, 不同处理土壤 DNA 模板 2.0 μ L, SYBR[®] *Premix EX Taq*[™] II 12.5 μ L, 加 ddH₂O 补充至总体积 25 μ L。PCR 参数见表 1, 扩增片段分别为 491bp 和 635bp。分别以含有氨氧化细菌氨单加氧酶 A(*amoA*)和氨氧化古菌氨单加氧酶 A(*Arch-amoA*)基因的重组 pGEM[®]-T 载体为标准质粒, 同 1.4.1 方法建立标准曲线。*E* 值分别为 104.0%和 90.9%, *R*² 分别为 0.994 和 0.995。

1.6 氨氧化古菌群落结构多样性分析

1.6.1 氨氧化古菌 *Arch-amoA* 基因克隆文库的构建

PCR 体系:*Arch-amoA*F/*Arch-amoA*R 引物 (25 mmol·L⁻¹)各 1.0 μ L, 适当稀释的 DNA 模板 1.0 μ L, *Premix Taq*[®] DNA 聚合酶 20.0 μ L, 加 ddH₂O 补充至总体积 50 μ L。PCR 热循环参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 扩增 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 16 $^{\circ}$ C 保存。采用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 用 DNA 纯化回收试剂盒回收目的片段。

将 *Arch-amoA* 基因扩增产物与 pGEM[®]-T 载体连接后转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞中。通过蓝白斑筛选, 挑取白斑克隆子, 每个淹水处理构建约 400 个克隆子的文库, 共 8 个克隆文库。

1.6.2 氨氧化古菌 *Arch-amoA* 基因序列测定

随机挑取克隆文库中的菌落作为模板, 用通用引物 M13 进行菌落 PCR 扩增, 每个处理得到约 100 个阳性克隆子, 随即挑取 10 个阳性克隆子由上海生物工程技术服务有限公司完成 *Arch-amoA* 基因序列的测定。

1.6.3 数据处理

将核苷酸相似度大于 97%的序列作为一个分类

操作单位(operational taxonomic unit, OTU), 进行多样性分析。参照王英等方法^[17]计算多样性指数, 包括 Shannon-Wiener 指数(*H'*)、Margalef 指数(*d*_M)、辛普森指数(Simpson index, *D*_s)及 Pielou 均匀度指数(*E*)。采用 UnFrac^[18]进行基于进化树的环境微生物构成的主成分分析(PCA)。

1.7 系统发育树的构建

用 MEGA4.0 软件构建基于 *arch-amoA* 基因的氨氧化古菌群落结构图, 选取相似度大于 97%参比菌株构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 水稻土细菌、泉古菌 16S rRNA 基因和氨氧化细菌 *amoA*、氨氧化古菌 *Arch-amoA* 基因 PCR 扩增

采用 PCR 技术从 8 个淹水处理的土壤总 DNA 中, 获得细菌和泉古菌的 16S rDNA 片段和氨氧化细菌 *amoA* 和氨氧化古菌 *Arch-amoA* 基因片段。图 1 为目的基因片段的琼脂糖电泳结果。由图 1 可以看出, 获得的 PCR 片段大小与预期一致, 且 PCR 产物特异性好, 条带单一, 可以进行后续的 Real-time PCR 和 *Arch-amoA* 基因文库构建。

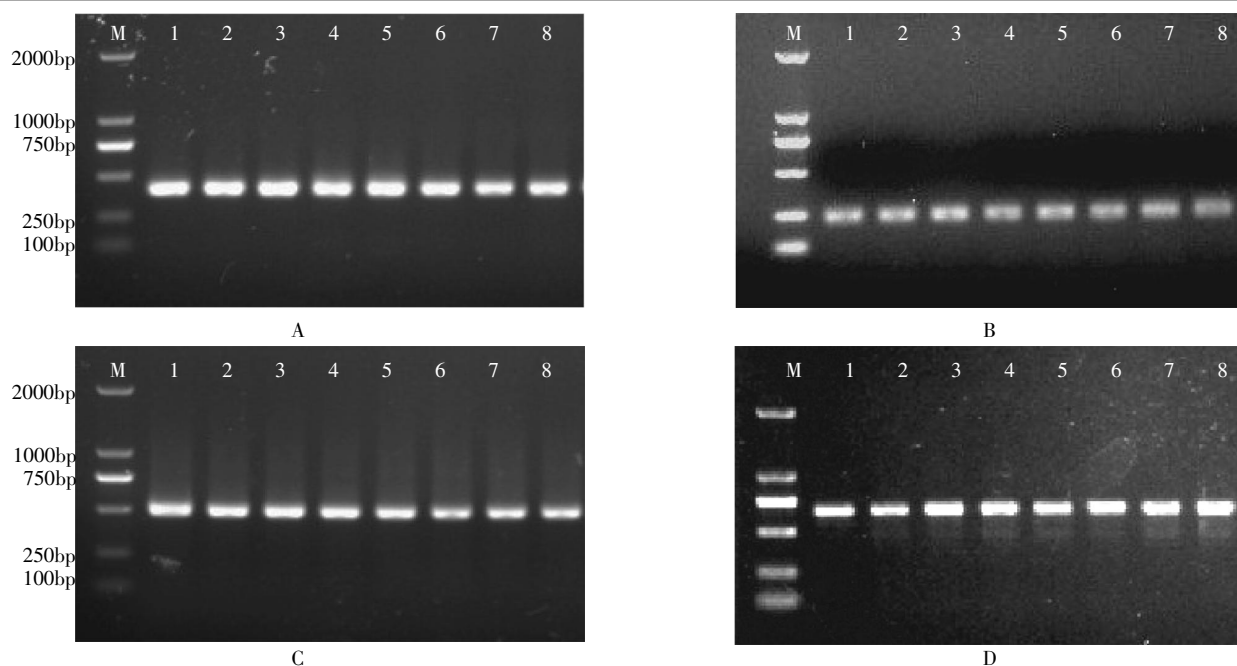
2.2 不同淹水时期水稻土氨氧化古菌丰度分析

应用 Real-time PCR 技术获得的细菌、泉古菌 16S rRNA 基因以及氨氧化细菌 *amoA* 基因和氨氧化古菌 *Arch-amoA* 基因拷贝数结果如图 2 所示。可以看出, ①水稻土淹水过程中细菌和泉古菌 16S rRNA 基因拷贝数、氨氧化细菌 *amoA* 和氨氧化古菌 *Arch-amoA* 基因拷贝数分别为每克风干土拷贝数在 $1.748 \times 10^9 \sim 4.429 \times 10^9$ 、 $0.469 \times 10^8 \sim 1.045 \times 10^8$ 、 $0.874 \times 10^6 \sim 2.780 \times 10^6$ 和 $0.724 \times 10^7 \sim 1.372 \times 10^7$ 之间; ②淹水 5 d 时丰度均达到峰值; ③细菌的丰度普遍大于泉古菌的, 是后者的 29.05~64.17 倍; ④淹水过程中 AOA 丰

表 1 Real-time PCR 扩增引物及反应条件

Table 1 Primers and reaction conditions of real-time PCR used in study

微生物 Target group	引物及其序列 Primers and their sequences	反应程序 Thermal profile	参考文献 Reference
细菌 Bacteria	Com1: CAGCAGCCGCGGTAATAC Com2: CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	95 $^{\circ}$ C 预变性 180 s, 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 40 个循环	[16]
泉古菌 Crenarchaeota	Cre-arch771F: ACGGTGAGGGATGAAAAGCT Cre-arch 957R: CGGCGTTGACTCCAATTG	95 $^{\circ}$ C 预变性 180 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环	[7]
氨氧化细菌 Ammonia oxidizing bacteria	<i>amoA</i> -1F: GGGGTTTCTACTGGTGTT <i>amoA</i> -2R: CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	95 $^{\circ}$ C 预变性 180 s, 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 40 个循环	[9]
氨氧化古菌 Ammonia oxidizing archaea	<i>Arch-amoA</i> F: STAATGCTCTGGCTTAGACG <i>Arch-amoA</i> R: GCGGCCATCCATCTGTATGT[S=G or C]	95 $^{\circ}$ C 预变性 180 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 25 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 40 个循环	[9]



A:细菌 16S rRNA 基因片段;B:泉古菌 16S rRNA 基因片段;C:氨氧化细菌 *amoA* 基因片段;

D:氨氧化古菌 *Arch-amoA* 基因片段;M 为 DL 2000 分子量标准;1~8 代表淹水处理:1 h、1 d、5 d、10 d、20 d、30 d、40 d 和 60 d

A: bacterial 16S rDNA genes, B: crenarchaeotal 16S rDNA genes, C: AOB *amoA* genes, D: AOA *arch-amoA* genes. M: DL 2000 DNA Marker. Lane 1~8: flooding time of 1 h, 1 d, 5 d, 10 d, 20 d, 30 d, 40 d and 60 d

图1 PCR 扩增的目的片段的琼脂糖电泳

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

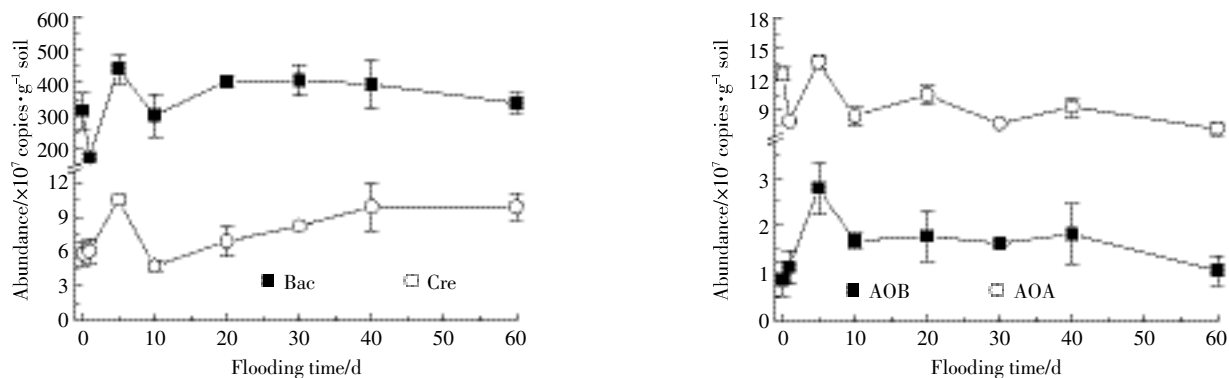


图2 淹水过程中水稻土细菌、泉古菌、氨氧化细菌和氨氧化古菌丰度

Figure 2 Abundance of bacteria (Bac), crenarchaeota (Cre), AOB and AOA at different flooding times

度高于 AOB 的,前者是后者的 4.753~14.01 倍。方差分析表明,各个淹水处理之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.3 不同淹水阶段水稻土氨氧化古菌多样性分析

每个淹水时间处理分别得到 10 个 *Arch-amoA*。将序列相似度大于 97% 的定义为 1 个 OTU,共产生了 16 个 OTU 类型。将 *Arch-amoA* 基因序列分成 3 个淹水阶段(淹水初期、中期和后期):淹水初期(ES)包括 1 h、1 d 和 5 d,中期(MT)包括 10 d、20 d 和 30 d,后期(LS)包括 40 d 和 60 d。针对上述 3 个淹水阶

段分析 OTU 类型、多样性指数和 PCA 变化。

2.3.1 OTU 分析

不同淹水阶段产生的 OTU 数目不同,淹水早期为 10 种,淹水中期为 9 种,淹水后期为 8 种。由图 3 可以看出,各个淹水阶段产生的 OTU 按照比例变化分为 4 种情况:①3 个淹水阶段共有的 OTU 类型,但存在的比例不同,如 T1、T8、T12 和 T16;②存在于淹水初期和中期,如 T10、T14 和 T15;③存在于淹水中期和后期,如 T7 和 T13;④存在于单个淹水时期的,如 T3、T6 和 T11 仅存在于淹水初期,T2 仅存在于淹

水中期,而 T4、T5 和 T9 仅存在于淹水后期。从 OTU 类型和比例变化可以看出,淹水过程中氨氧化古菌的群落结构发生了演替性变化。

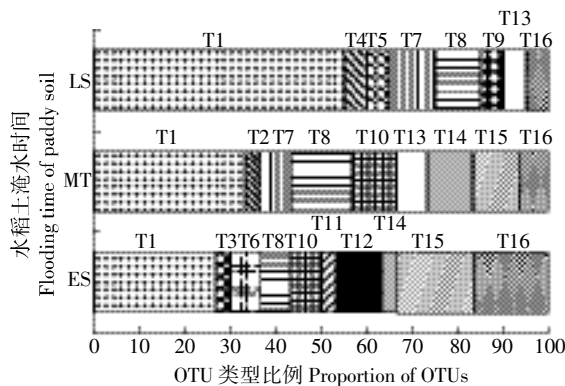


图 3 不同淹水阶段 *Arch-amoA* 基因 OTU 类型与比例

Figure 3 The OTU patterns and its proportion of *arch-amoA* gene in paddy soils

2.3.2 多样性指数分析

基于 3 个淹水阶段的氨氧化古菌 *Arch-amoA* 基因 OTU 类型的多样性指数结果见表 2。淹水初期的 Shannon-Wiener 指数 (H')、Simpson index (D_s) 和物种丰富度指数 (d_{M}) 均为最大;淹水后期多样性指数减小,表明不同淹水时间对水稻土氨氧化古菌多样性有影响。

表 2 不同淹水阶段中氨氧化古菌的多样性指数分析

Table 2 Diversity indices of ammonia-oxidizing archaea in paddy soil at different flooding stages

处理 Treatments	香农指数 Shannon- Wiener index (H')	辛普森指数 Simpson index (D_s)	丰富度 Richness (d_{M})	均匀度 Evenness (E)
ES	2.062	0.846 7	2.646	0.895 4
MT	1.981	0.826 7	2.352	0.901 4
LS	1.538	0.665 0	2.337	0.739 8

2.3.3 PCA 分析

通过系统发育分析获得 3 个淹水阶段中氨氧化古菌 *Arch-amoA* 基因的序列进化关系,然后进行 UniFrac 主成分分析,比较不同淹水阶段中氨氧化古菌群落结构组成差异。图 4 为 UniFrac 主成分关联分析散点图,反映了多元变量之间的内在联系。由图 4 可知,代表样品 ES 和 MT 以及 LS 环境样本点相互之间呈等距离散分布,形成三个明显的类群,说明 3 个淹水阶段的氨氧化古菌群落构成差异较大。

2.4 氨氧化古菌的进化定位

在 GenBank 数据库中比对 *Arch-amoA* 基因序

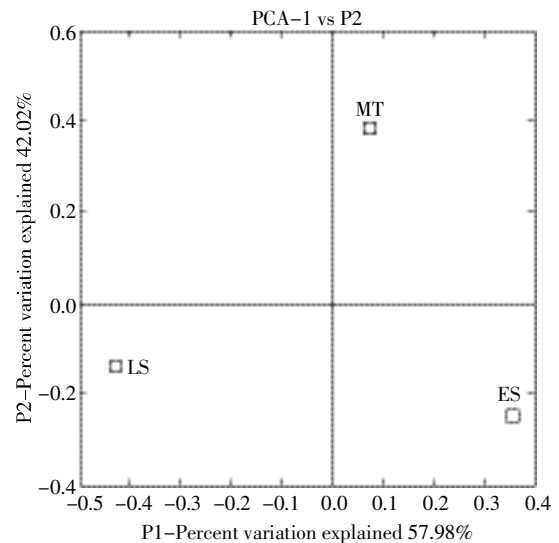


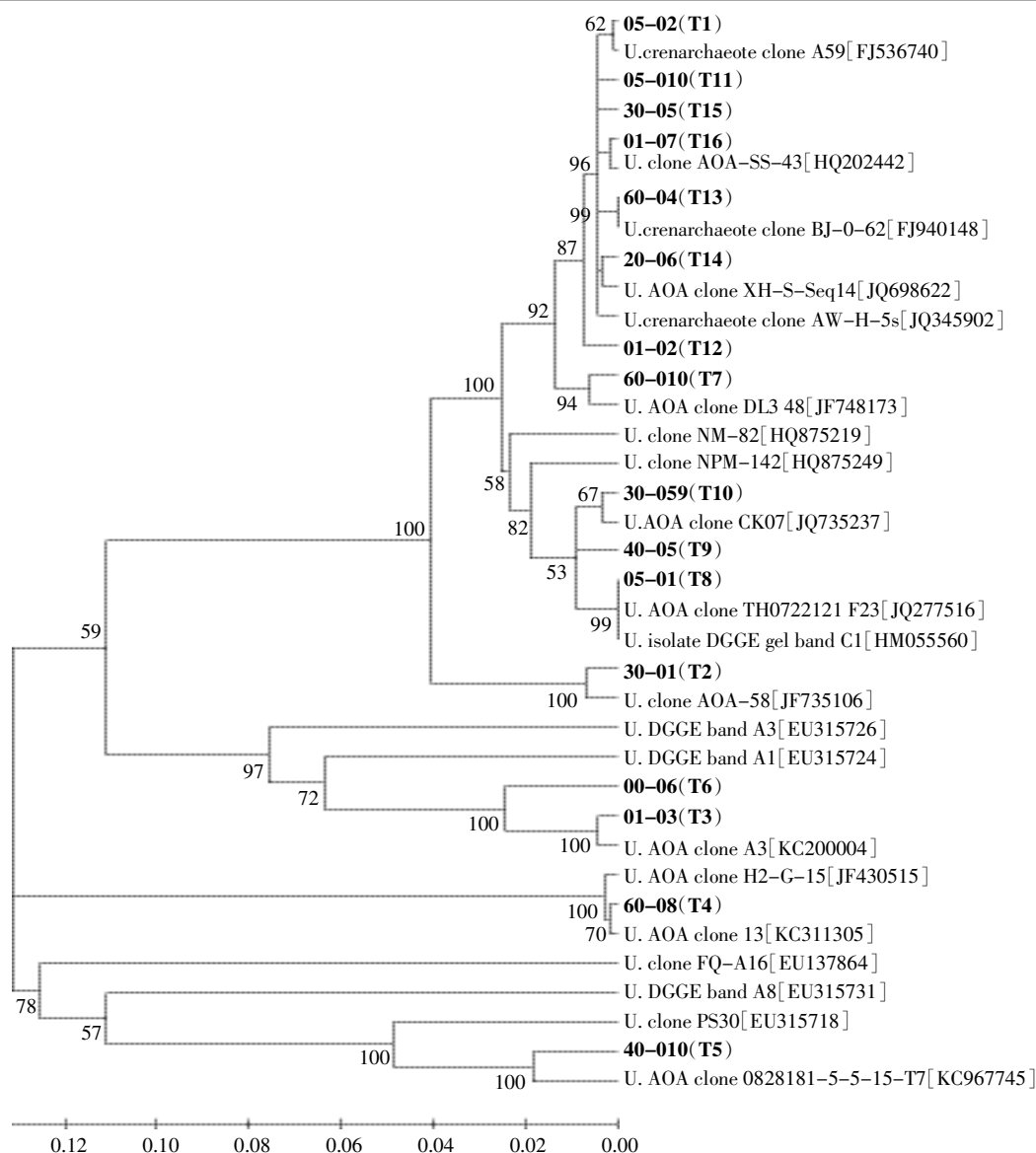
图 4 不同淹水阶段的主成分关联分析散点图

Figure 4 Scatter Plot of PCA analysis by UniFrac for ammonia-oxidizing archaea in paddy soil at different flooding stages

列,挑取数据库中相似性大于 98% 的序列作为参比序列,构建系统发育树,结果见图 5。从图 5 可以看出,参与建树的为本文获得的 16 种 *Arch-amoA* OTU 类型,它们均属于泉古菌,且与来自水稻根际土壤^[14]、小麦根际土^[10]、红壤^[19]、沉积物和水体^[20]中的氨氧化古菌关系密切。

3 讨论

从 Real-time PCR 的结果可以看出,在淹水培养的早期(1~5 d),细菌、泉古菌、氨氧化细菌和氨氧化古菌的丰度都几乎达到了峰值,可能是因为对淹水条件的适应以及营养物质充足(土壤处理时的干土效应,对土壤氮素的矿化有明显促进作用^[21]),有利于微生物迅速繁殖。不同淹水处理中 AOA 的丰度呈现较小的波动性变化,可能是因为 AOA 与土壤中的矿化微生物紧密结合,利用土壤中有机质持续矿化所释放的低浓度 NH_3 进行自养生长,从而更容易获得持续的底物供给^[4]。此外,AOA 也可能进行混合营养型生长,直接利用有机碳源^[22]。泉古菌的丰度大致在 5 d 和 40~60 d 两次达到最大值,原因是泉古菌中可能存在着 r 和 k 生存策略的两种物种,其中的 AOA 大多可能属于 k 策略生存的菌种。从丰度结果看,前期采用 r 策略的泉古菌物种迅速增长繁殖,成为优势菌种,丰度最大值对应的淹水时间分别为 5~10 d。随着营养物质的消耗,采用 k 策略的泉古菌物种逐渐取代了 r 策略的物种,成为培养后期的优势物种,丰度再次达到



黑体字表示本文获得的 OTU 编号和类型,刻度尺表示 2% 序列估计偏差;U.代表 uncultured, AOA 代表氨氧化古菌
 Bold fonts indicate OTU codes and types obtained in this study. The scale bar represents 2% estimated sequence divergence;
 U stands for uncultured; AOA stands for ammonia oxidizing archaea

图 5 基于 *Arch-amoA* 序列构建的氨氧化古菌系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree constructed with neighbour-joining method based on *arch-amoA* gene sequences

最大值,对应的淹水时间分别为 40~60 d。从 AOA/Cre 和 AOB/Bac 相对比值可以看出(表 3),淹水培养 1 h~1 d 时, AOB/Bac 呈显著增大的趋势,并达到最大值,这是因为厌氧 AOB 是严格的化能自养型物种^[23],淹水初期营养物质充足,且在淹水条件下利于其快速繁殖,当后期营养物质消耗殆尽时, AOB 的比例也逐渐较少;除 1 h 处理, AOA/Cre 峰值退后出现在 10 d。结合 AOA 和 AOB 的丰度及相对比值变化结果可以看出,淹水条件下 AOA 比 AOB 更具竞争优势。与 AOB 相比, AOA 具有独特的生理生化 and 遗传特征。对几株

纯培养 AOA 的基因组学分析表明, AOA 的氨氧化途径可能与 AOB 显著不同,并且 AOA 的氨氧化过程和碳固定过程减少了能量的消耗,有助于其在不利环境下发挥作用^[24]。

不同淹水时间对土壤微生物的群落结构产生一定影响。Noll 等^[25]认为非种植水稻土中细菌的群落结构会随着淹水时间发生演替性变化。水稻土淹水培养 21 d 后,细菌群落结构趋于稳定。本试验中,3 个淹水时期共得到 16 种 AOA 的 OTU 类型。从优势 OTU 类型的变化可以看出,淹水过程中 AOA 存在明显的演

表3 淹水过程中水稻土 AOB 和 AOA 丰度的相对变化

Table 3 Relative changes of AOB and AOA abundance in paddy soil during flooding

淹水时间	AOB/Bac(‰)	AOA/Cre(%)
1 h	0.277 5	21.66
1 d	0.645 7	13.22
5 d	0.627 5	13.05
10 d	0.558 1	18.06
20 d	0.440 6	15.26
30 d	0.399 5	9.439
40 d	0.460 8	9.483
60 d	0.312 7	7.345

替变化。例如,随着淹水的持续,T1代表的AOA从26.7%增加至55%,T16则由16.7%减少至5%,表明相应的AOA虽然存在于整个淹水过程中,但是比例发生了变化;T3、T6和T11类型的AOA仅存在于淹水初期,后期被T4、T5和T9所取代,表明AOA发生了明显的演替变化。PCA分析将3个淹水时期分成独立的生境,也表明了群落结构演替剧烈。淹水初期有利于各类微生物的生长,导致氨氧化古菌在多样性上占据优势,而淹水后期尽管AOA具有比AOB更强的逆境生长优势,但其各类指数还是受到了影响,导致不论是多样性和均匀度都有所降低。淹水环境对水稻土AOA的多样性也产生了影响。

Ding等^[26]按照Arch-amoA蛋白的氨基酸序列将AOA分为Cluster I和Cluster II等两大类,前者主要分布在陆地土壤及沉积物环境中,后者主要存在于海洋及海底沉积物中。Chen等^[14]将基于Arch-amoA基因的AOA按照来源分成土壤/沉积物、水体和沉积物3类。本文得到的80条氨氧化古菌Arch-amoA序列与已知的土壤/沉积物环境中的序列有很高的相似性,图5表明16种AOA类型分属上述3种类型。

O₂是微生物硝化作用的主要影响因子。水稻根系能分泌O₂,这些O₂能被土壤硝化微生物利用,从而将NH₄⁺氧化成NO₃⁻^[27]。研究表明,水生和陆生植物根际能够促进古菌种群,而来自奇古菌门(Thaumarchaeota)中硝化球菌属(Nitrososphaerales)的AOA更喜爱根际的生长环境^[28]。在本实验淹水非种植水稻土微环境系统中,水稻土置于相对严格的厌氧环境下,其并不能完全反映真实的种植水稻的水稻根际土的淹水状况。今后应进行供试水稻土在种植条件下的根际和非根际土壤中AOA的群落结构特征及其与水稻

根系泌氧的关系的研究。

4 结论

淹水处理改变了水稻土中细菌和泉古菌的丰度,其中的AOA比AOB的丰度高;从相对比值变化上可以看出,AOB的丰度峰值在淹水1d,而AOA的峰值推后出现在淹水10d,淹水过程中AOA群落结构发生了明显演替变化,随着淹水持续,r策略AOA被k策略取代。16种OTU类型代表的氨氧化古菌与来自水稻土、旱地土壤、红壤和沉积物等来源的氨氧化古菌关系密切。

参考文献:

- [1] 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[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2010, 21(8):2154-2160.
- [2] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea[J]. Science, 2004, 304(5667): 66-74.
- [3] Könneke M, Bernhard A E, Walker C B, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon[J]. Nature, 2005, 437(7058):543-546.
- [4] 贺纪正,沈菊培,张丽梅.土壤硝化作用的新机理:氨氧化古菌在酸性土壤氨氧化中的主导作用[J].科学观察,2012,7(6):58-60.
HE Ji-zheng, SHEN Ju-pei, ZHANG Li-mei. The new mechanism of soil nitrification: Ammonia oxidizing archaea leading role on ammonification in the acid soil[J]. Science Focus, 2012, 7(6):58-60.
- [5] Leininger S, Urich T, Schlöter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. Nature, 2006, 442(7104):806-809.
- [6] 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.
- [7] 沈菊培,张丽梅,贺纪正.几种农田土壤中古菌、泉古菌和细菌的数量分布特征[J].应用生态学报,2011,22(11):2996-3002.
SHEN Ju-pei, ZHANG Li-mei, HE Ji-zheng. Abundance of archaea, crenarchaea and bacteria in selected agricultural soils of China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, 22(11):2996-3002.
- [8] 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.
- [9] 宋亚娜,陈在杰,林智敏.水稻生育期内红壤稻田氨氧化微生物数量和硝化势的变化[J].中国生态农业学报,2010,18(5):954-958.
SONG Ya-na, CHEN Zai-jie, LIN Zhi-min. Abundance of ammonia-oxidizer and potential nitrification rate of quaternary red-clay paddy soil

- during rice growth[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2010, 18(5):954-958.
- [10] 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[J]. *China Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(4):743-749.
- [11] 邱昭政, 罗专溪, 赵艳玲, 等. 溶氧对富集培养的河口湿地表层沉积物氨氧化菌多样性及氨氧化速率的影响[J]. *环境科学*, 2013, 34(2):532-539.
- QIU Zhao-zheng, LUO Zhuan-xi, ZHAO Yan-ling, et al. Effect of dissolved oxygen on diversity of ammonia-oxidizing microorganisms in enrichment culture from estuarine wetland surface sediments and ammonia-oxidizing rate[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(2):532-539.
- [12] 周磊榴, 祝贵兵, 王衫允, 等. 洞庭湖岸边带沉积物氨氧化古菌的丰度、多样性及对氨氧化的贡献[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(6):1741-1747.
- ZHOU Lei-liu, ZHU Gui-bing, WANG Shan-yun, et al. Abundance, biodiversity and contribution to ammonia-oxidization of ammonia-oxidizing archaea in littoral sediments of Dongting Lake[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(6):1741-1747.
- [13] 曹志洪, 林先贵, 杨林章, 等. 论“稻田圈”在保护城乡生态环境中的功能 I. 稻田土壤磷素径流迁移流失的特征[J]. *土壤学报*, 2005, 42(5):97-102.
- CAO Zhi-hong, LIN Xian-gui, YANG Lin-zhang, et al. Ecological function of “Paddy field ring” to urban and rural environment: I. Characteristics of soil P losses from paddy fields to waterbodies with runoff[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(5):97-102.
- [14] Chen X P, Zhu Y G, Xia Y, et al. Ammonia-oxidizing archaea: Important players in paddy rhizosphere soil?[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(8):1978-1987.
- [15] Lüdeman H, Arth I, Liesack W. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2):754-762.
- [16] Lerm S, Kleyböcker A, Miethling-Graff R, et al. Archaeal community composition affects the function of anaerobic co-digesters in response to organic overload[J]. *Waste Management*, 2012, 32(3):389-399.
- [17] 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.
- [18] Lozupone C, Knight R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12):8228-8235.
- [19] He J Z, Zheng Y, Chen C R, et al. Microbial composition and diversity of an upland red soil under long-term fertilization treatments as revealed by culture-dependent and culture-independent approaches[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2008, 8(5):349-358.
- [20] Gao J F, Luo X, Wu G X, et al. Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 138(6):285-296.
- [21] 朱强, 马丽, 马强, 等. 不同浸提剂以及保存方法对土壤矿质氮测定的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2012, 20(2):138-143.
- ZHU Qiang, MA Li, MA Qiang, et al. Content of soil mineral nitrogen as influenced by sample extraction and preservation[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2012, 20(2):138-143.
- [22] Ingalls A E, Shah S R, Hansman R L, et al. Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(17):6442-6447.
- [23] 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.
- [24] Walker C B, De La Torre J R, Klotz M G, et al. Nitrosopumilus maritimus genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(19):8818-8823.
- [25] Noll M, Matthies D, Frenzel P, et al. Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(3):382-395.
- [26] 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.
- [27] 段英华, 张亚丽, 沈其荣. 水稻根际的硝化作用与水稻的硝态氮营养[J]. *土壤学报*, 2004, 41(5):803-809.
- DUAN Ying-hua, ZHANG Ya-li, SHEN Qi-rong. Nitrification of rice rhizosphere and nitrate nitrogen nutrition of rice[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(5):803-809.
- [28] Ke X B, Angel R, Lu Y H, et al. Niche differentiation of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers in rice paddy soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(8):2275-2292.