

长期施肥对黄棕壤性水稻土氨氧化细菌多样性的影响

裴雪霞^{1,2}, 周卫^{1*}, 梁国庆¹, 孙静文¹, 王秀斌¹, 李双来³

(1 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081; 2 山西省农业科学院小麦研究所, 山西临汾 041000

3 湖北省农业科学院植保土肥所, 湖北武汉 430064)

摘要: 以湖北省农科院长期施肥试验站的黄棕壤性水稻土为研究对象, 采用 PCR-DGGE 方法, 研究了氮肥 (N)、氮磷 (NP)、氮磷钾 (NPK)、有机肥 (M)、有机肥 + 氮磷钾 (MNPK) 长期施用对土壤氨氧化细菌遗传多样性的影响。结果表明, 与长期不施肥处理 (CK) 相比, 长期施肥提高了黄棕壤性水稻土有机质、全氮、微生物量碳氮 (SMB-C, SMB-N) 含量, 并改变了氨氧化细菌的群落结构。其中有机肥与化肥长期配施下氨氧化细菌的多样性高于化肥处理。氨氧化细菌聚类分析表明, 稻麦收获后土壤氨氧化细菌 DGGE 图谱分别聚为一个族群; 同一作物收获后, 有机肥和有机肥 + 氮磷钾聚为一类, N、NP、NPK 和 CK 聚为一类, 后者内部分类在两季作物间有差别。DGGE 指纹图谱条带序列分析表明, 供试土壤的优势氨氧化细菌为 β -变形菌纲的亚硝化单胞菌和亚硝化螺旋菌。

关键词: 长期施肥; 水稻土; 微生物量碳氮; 氨氧化细菌; PCR-DGGE

中图分类号: S154.37 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-505X(2011)03-0724-07

Effects of long-term fertilization on ammonium oxidizing bacterial diversity in a paddy soil derived from yellow-brown earth

PEI Xue-xia^{1,2}, ZHOU Wei^{1*}, LIANG Guo-qing¹, SUN Jing-wen¹, Wang Xiu-bin¹, LI Shuang-lai³

(1 Agricultural Resources and Regional Planning Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2 Wheat Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Linfen 041000, China;

3 Institute of Plant Protection, Soil and Fertilizer, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China)

Abstract Effects of long-term application of N, NP, NPK, M (pig manure), and MNPK (pig manure plus NPK) on soil microbial carbon (SMB-C), soil microbial nitrogen (SMB-N), and ammonium oxidizing bacterial (AOB) diversity in a paddy soil derived from yellow-brown earth in Hubei Academy of Agricultural Sciences were studied. Results showed that all fertilizer treatments tended to increase soil organic matter, total N, SMB-C (N), and alter the AOB community compared with the control. Among the six treatments, MNPK acquired more complex AOB community structure than those of chemical fertilizers application only. Unweighted Pair Group Method Clustering (UPGMC) analysis of the DGGE banding patterns showed that treatments harvesting rice and wheat were divided to two classes respectively. After the same crop harvested, all treatments were divided to two classes. M and MNPK were grouped into one class, and N, NP, NPK and CK were clustered into the other. And there were difference between rice and wheat harvested in the latter class. Sequence analysis of prominent bands in DGGE profiles showed that *Nitrosopira* and *Nitrosomonas* within β -proteobacteria were the dominant ammonium oxidizing bacteria in studied soil.

Key words long-term fertilization; paddy soil; soil microbial carbon and nitrogen; ammonium oxidizing bacteria; PCR-DGGE

收稿日期: 2010-03-20 接受日期: 2011-01-19

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201003016); 国家重点基础研究发展计划课题(2007CB109307); 国家水稻产业技术体系课题; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金; 山西省农科院博士基金(YBSJJ1107)资助。

作者简介: 裴雪霞(1973—), 女, 山西襄汾人, 博士, 助理研究员, 主要从事养分循环研究。E-mail: peixuexia@163.com

* 通讯作者 E-mail: wzhot@caas.ac.cn

施肥是影响土壤质量及农田可持续利用最重要的农业措施之一,对作物产量、土壤质量和生物肥力等产生重要影响。土壤微生物作为土壤环境中重要的生命有机体,其生物学特性和群落结构与土壤质量关系十分密切,因此对土壤微生物多样性研究具有重要意义^[1-4]。20世纪后期,用微生物量、土壤酶及土壤微生物数量等生物指标来表征土壤质量及土壤微生物多样性曾受到广泛关注^[5-6]。变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术通过链式聚合酶反应(PCR),可快速从土壤中扩增特定微生物DNA片段,通过DGGE变性胶加以分离,进一步对关键条带测序及生物信息学分析,揭示所研究土壤微生物群落结构组成及演变特征。Muzyer等^[7]于1993年首次将该技术应用于微生物生态学领域,现已广泛应用于土壤微生物种群多样性研究和种群的动态监测^[8-9]。

氨氧化细菌是能够将氨氧化成亚硝酸盐的关键微生物,是影响硝化作用速率的主要因素,被认为是研究土壤微生物生态学的模式生物^[10-12]。长期施肥对土壤微生物量及微生物群落结构的影响已有报道,如Zhang等^[13]研究了长期施肥对太湖流域水稻土细菌群落结构的影响;Gu等^[14]及钟文辉等^[15]分别研究了长期施肥对石灰性紫色土和红壤微生物量及氨氧化细菌群落结构的影响。黄棕壤属于盐基不饱和弱富铝化淋溶土,农业复种指数大、土壤肥力变化较快,近年来土壤质量和作物增产潜力下降等问题备受关注。目前有关长期施肥对黄棕壤性水稻土质量的研究,仅局限于土壤养分状况和酶活性等方面,关于不同施肥处理对土壤微生物遗传多样性的影响研究较少。本研究采用PCR-DGGE技术,研究了长期施肥对黄棕壤性水稻土氨氧化细菌遗传多样性的影响,以期为该类土壤建立可持续施肥制度,提高生物肥力和土壤质量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

供试土样取自始于1981年的湖北省农科院长期肥料定位试验。供试土壤为黄棕壤性水稻土,质地粘壤。耕层土壤基本理化性状为:有机质 27.43 g/kg 全氮 1.801 g/kg 全磷 1.004 g/kg 碱解氮 150.7 mg/kg 速效磷 5.0 mg/kg 速效钾 98.5 mg/kg pH 6.3。试验设6个处理:1)不施肥(CK);2)单施氮肥(N);3)氮磷配施(NP);4)氮磷钾配施(NPK);5)单施有机肥(M);6)有机肥与氮磷钾配施(MNPK)。小区面积 40 m²,3次重复,随机排

列。试验为中稻和冬小麦轮作制度。根据设计要求,年化肥用量为 N 150 kg/hm²、P₂O₅ 75 kg/hm²、K₂O 150 kg/hm²,中稻和冬小麦总施肥量比例为 6:4 有机肥为充分腐熟的猪粪,每年施用 22500 kg/hm²,中稻和冬小麦各施 1/2 磷、钾肥和有机肥均采用移栽或播种前一次基施;氮肥中稻季采用基肥:分蘖肥:穗肥 = 2:2:1 冬小麦季采用基肥:腊肥:拔节肥 = 2:1:1。

1.2 取样及测定方法

为排除作物生长和田间管理对土壤生物肥力的影响,分别于2008年10月水稻收获时(水稻季)和2009年6月小麦收获时(小麦季)采取0—20 cm土层非根际土壤样品。鲜土去除植物残体,过2 mm筛后分为3部分:一部分土样保存于4℃,一周内测定微生物量碳、氮;一部分土样保存于-20℃,用于PCR-DGGE分析;其余土样风干,用于测定土壤基本理化性状。

土壤pH值用水浸提(水土比2.5:1)pH计测定;有机质用重铬酸钾容量法(外加加热法)测定;全氮用半微量凯氏定氮法;土壤含水量用铝盒烘干法测定;NO₃-N、NH₄⁺-N含量用2 mol/L KCl提取, Foss公司的流动注射分析仪(德国产)测定;土壤微生物量碳、氮用氯仿熏蒸-K₂SO₄浸提法,浸提液中的微生物量采用重铬酸钾容量法(磷酸浴)测定,微生物量氮用凯氏定氮法测定,换算系数分别为0.38和0.45。

1.3 土壤氨氧化细菌群落的PCR-DGGE分析

1.3.1 土壤微生物基因组DNA提取及纯化 土壤微生物基因组DNA的提取和纯化参见文献[8]。

1.3.2 氨氧化菌16S rDNA的PCR扩增采用Nested-PCR程序 第一次PCR:所用引物为扩增氨氧化细菌16S rDNA的引物CTO189Abf CTO189Cf和CTO654g 反应体系为PCR Easy SuperMix(Transgen Beijing) 25 μL, 每种引物1 μL(25 pmol/μL), 0.5 μL稀释10倍的土壤总DNA,加ddH₂O至最终体积50 μL。为减少扩增过程中的非特异性产物,采用Touch-down PCR程序。反应程序:94℃预变性5 min 94℃ 1 min 65~55℃ 50 s(每个循环温度降低0.5℃),72℃ 1.30 min 20个循环,然后在其它条件不变的情况下,在55℃的退火温度下继续扩增10个循环,72℃ 7 min 最后于4℃恒定保存。

第二次PCR:第一次PCR产物稀释10倍后作模板,引物为P338f-GC和P518g 反应体系为PCR HiFi SuperMix(Transgen Beijing) 25 μL, 每种引物1 μL(25 pmol/μL),模板DNA 1 μL,加ddH₂O至最终体积50 μL。反应程序是在第一轮PCR的基础上,

退火温度变为在前 20 个循环中为 63~53℃, 后 10 个循环为 53℃, 其它步骤与第一轮 PCR 相同。取 PCR 产物各 3 μL, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 (D-code TM, Bio-Rad), Bio-Rad 公司凝胶成像系统 (Gel Doc Documentation System) 观察。

1.3.3 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析、DGGE 带的回收与测序 取第二次 PCR 产物 35 μL 进行 DGGE 分析, 变性剂梯度范围为 30%~50%, 从正极到负极逐渐递增, 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 6%~12% (W/V)。在 1×TAE 缓冲液中, 预热后点样, 60V 电压、60℃下电泳 13 h。电泳完毕后用 1 μL SyBR green I (Sigma) (1×TAE 稀释 10000 倍) 核酸染料染色 30 min, 用 0.5×TAE 缓冲液浸泡 15 min 后成像、拍照。在紫外灯下将凝胶中较亮的条带用刀片小心切下。将胶条浸于 40 μL 无菌超纯水中, 用枪尖捣碎, 4℃放置过夜, 使 DNA 片段溶出。取 4 mL DNA 浸出液作为模板, 按照 1.3.2 中第二次 PCR 的方法进行扩增, 扩增产物再用 DGGE 电泳验证扩增片段与所回收条带的电泳行为是否一致。确定所回收条带的正确位置后, 用引物 P338f 和 P518r 再进行 PCR 扩增, PCR 产物送给上海生物工程技术服务有限公司测序。序列信息输入 NCBI [National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)] 数据库进行 BLAST (Basic local alignment search tools) 分析。

用 Quantity one 软件进行 Shannon 多样性指数 (H) 和丰富度指数 (S) 的计算和聚类分析。其中聚类分析用 UPGMA 方法。Shannon 指数的计算是基于 DGGE 胶条带位置和条带强度, 而条带的强度则通过条带的峰面积来表示:

$$H = -\sum (n_i/N) \ln (n_i/N)$$

式中: n_i 为单一条带的峰面积, N 为所有峰的总面积。

DGGE 所用仪器为 the D-code TM Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Co.)。所有扩增引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成。具体引物序列参见文献 [12]。

数据方差分析使用 DPS11.0 统计软件, DGGE 带谱聚类分析使用专业软件 (Quantity One, Bio-Rad USA), 系统发育树用 Mega4.1 进行分析作图。

2 结果与分析

2.1 长期施肥对土壤基本性状及微生物量碳、氮含量的影响

与单施化肥相比, M 和 MNPK 处理显著提高了

土壤有机质、全氮和 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量; NPK 处理与 CK 相比, 也显著提高了土壤有机质和全氮含量; 单施 N 处理与 CK 间养分含量差异均不显著 (表 1)。

长期不同施肥对土壤微生物量碳、氮均产生显著影响。与 CK 相比, 水稻季和小麦季长期施肥使土壤微生物量碳分别提高了 27.08%~192.00% 和 1.33%~42.87%, 其中 MNPK 和 M 处理微生物量碳含量最高, 且与化肥处理间差异均达显著水平。水稻季 NPK 与 NP, N 与 CK, 小麦季化肥与 CK 间差异均未达显著水平。微生物量氮与微生物量碳的变化趋势相似, M 和 MNPK 微生物量氮含量提高幅度最大。

表 1 还看出, 作物收获时, 水稻季土壤含水量为 29.14%~32.81%, 处理间差异不显著; 小麦季为 15.83%~19.67%, M 和 MNPK 处理显著高于仅施化肥处理和 CK。与试验开始时 (pH 为 6.3) 相比, 黄棕壤性水稻土 pH 值提高了 0.61~1.37 个单位, NPK、M 和 MNPK 处理较 CK 显著减缓了土壤碱性的速度。

2.2 氨氧化细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 图谱分析及序列

2.2.1 长期施肥下氨氧化细菌微生物群落 DGGE 图谱分析 应用 DGGE 技术对黄棕壤性水稻土 16S rDNA 氨氧化细菌 PCR 产物进行分离。图 1 看出, 不同处理的氨氧化细菌 PCR 产物均分离为许多的 DNA 条带, 且不同土壤样品出现的 DNA 条带的带型不同。结合 DGGE 图谱的 Shannon 多样性指数和丰富度指数 (表 2) 分析看出, 供试土壤的电泳条带数目及多样性均明显不同, 充分表明了黄棕壤性水稻土氨氧化细菌的多样性。不同处理间拥有一些共同的 DNA 条带, 表明同一土壤不同施肥处理间存在许多共同的氨氧化细菌类群, 但共有条带的信号强度 (DNA 条带亮度) 不同 (如箭头所示), 表明不同的施肥处理对土壤氨氧化细菌类群的数量有较大影响。

从 Shannon 多样性指数和条带丰富度指数 (表 2) 看出, 不论是淹水种植水稻后还是旱季种植小麦后, M 和 MNPK 明显增加了 DNA 条带数量和条带信号强度 (如条带 4 和条带 5), Shannon 多样性指数最高, 说明有机肥的施用提高了黄棕壤性水稻土氨氧化细菌的多样性。不施肥或仅施氮肥, 易造成土壤严重缺磷, 不利于土壤中氨氧化细菌的繁殖, 故条带数量较少, 氨氧化细菌种群丰富度较低。

表 1 长期施肥对土壤养分及微生物量碳、氮含量的影响
Table 1 Effects of long-term fertilization on soil nutrients and SMB-C, SMB-N content

处理 Treatments	有机质 OM (g/kg)	全氮 Tot. N (g/kg)	NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	微生物量碳 SMB-C (mg/kg)	微生物量氮 SMB-N (mg/kg)	含水量 Water content (%)	pH
水稻季 CK	31.00 ± 1.85 bc	1.58 ± 0.09 d	3.06 ± 0.63 c	5.26 ± 0.14 a	324.20 ± 19.03 d	27.73 ± 3.98 d	29.14 ± 5.51 a	7.34 ± 0.06 ab
Rice N	29.41 ± 1.28 c	1.63 ± 0.11 cd	3.69 ± 0.32 c	5.69 ± 0.86 a	411.99 ± 43.72 d	37.91 ± 8.93 cd	30.90 ± 3.02 a	7.37 ± 0.06 a
season NP	33.47 ± 2.19 bc	1.85 ± 0.10 bc	3.67 ± 0.54 c	5.91 ± 1.12 a	548.96 ± 34.07 c	59.73 ± 9.33 bc	30.06 ± 2.58 a	7.10 ± 0.01 bc
NPK	34.99 ± 0.92 b	1.93 ± 0.05 b	3.21 ± 0.56 c	6.90 ± 1.74 a	638.45 ± 86.68 c	85.24 ± 8.28 b	31.76 ± 4.03 a	6.91 ± 0.11 c
M	41.13 ± 3.98 a	2.32 ± 0.19 a	5.10 ± 0.51 b	6.13 ± 1.63 a	799.92 ± 16.26 b	197.78 ± 6.75 a	32.39 ± 3.59 a	7.01 ± 0.01 c
MNPK	44.71 ± 2.74 a	2.56 ± 0.14 a	8.04 ± 0.47 a	6.56 ± 0.27 a	946.68 ± 79.88 a	206.67 ± 15.30 a	32.81 ± 1.53 a	7.03 ± 0.16 c
小麦季 CK	30.67 ± 1.57 bc	1.48 ± 0.07 bc	4.67 ± 0.28 c	2.20 ± 0.41 a	469.58 ± 58.88 b	38.39 ± 3.98 c	16.25 ± 0.64 b	7.59 ± 0.03 ab
Wheat N	29.48 ± 1.94 c	1.40 ± 0.04 c	5.09 ± 0.60 c	2.27 ± 0.61 a	463.54 ± 34.16 b	41.24 ± 5.67 c	16.45 ± 0.35 b	7.67 ± 0.08 a
season NP	31.87 ± 1.35 b	1.48 ± 0.09 bc	4.78 ± 1.59 c	2.08 ± 0.59 a	475.83 ± 42.49 b	52.73 ± 3.42 c	15.83 ± 0.40 b	7.35 ± 0.07 bc
NPK	32.18 ± 1.17 b	1.53 ± 0.06 b	6.60 ± 1.44 c	1.49 ± 0.21 ab	510.86 ± 87.74 b	75.24 ± 5.62 b	16.31 ± 0.38 b	7.15 ± 0.13 cd
M	38.53 ± 0.93 a	1.93 ± 0.05 a	10.82 ± 1.28 b	1.13 ± 0.27 b	662.92 ± 106.45 a	157.45 ± 8.78 a	19.67 ± 0.64 a	7.11 ± 0.26 cd
MNPK	39.79 ± 0.67 a	1.89 ± 0.06 a	15.36 ± 1.61 a	1.85 ± 0.49 ab	670.87 ± 32.65 a	166.00 ± 20.24 a	19.58 ± 0.77 a	6.92 ± 0.27 d

注(Note): 数值后不同小写字母表示处理间差异达5%显著水平 Values followed by different letters mean significant at 5% level.

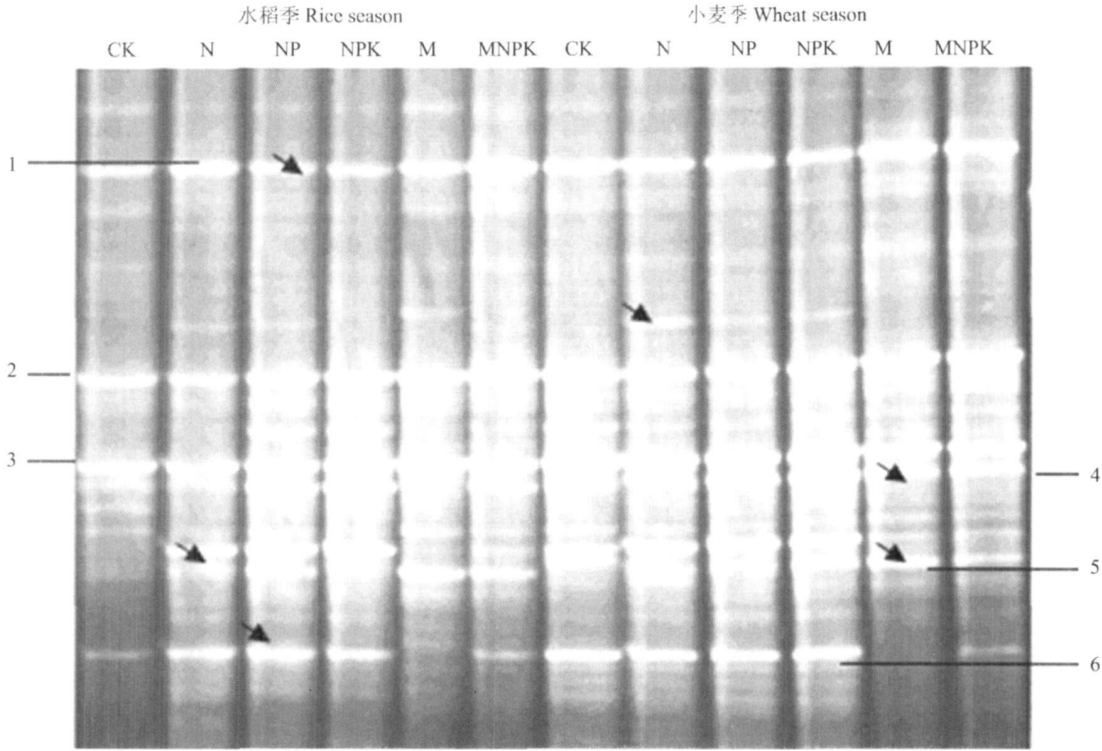


图 1 收获水稻后和收获小麦后土壤氨氧化细菌的 DGGE 指纹图谱 (图中 1、2、3、4、5 和 6 代表氨氧化细菌 DNA 条带)
Fig 1 DGGE profile of ammonium oxidizing bacterial communities of the soil after rice and wheat harvest
(1, 2, 3, 4, 5, 6 means DNA bands of ammonium oxidizing bacterial in the figure respectively)

表 2 黄棕壤性水稻土氨氧化细菌多样性指数和丰富度
Table 2 Shannon index (H) and richness (S) in paddy soil from yellow brown earth

项目 Item	水稻季 Rice season						小麦季 Wheat season					
	CK	N	NP	NPK	M	MNPK	CK	N	NP	NPK	M	MNPK
Shannon(H)	1.79	1.86	1.96	2.35	2.65	2.71	1.83	1.9	1.9	2.23	2.38	2.43
丰富度 (S)	10	13	14	12	17	19	13	14	14	15	16	18

注 (Note): H—Shannon index, S—Richness

水稻收获后和小麦收获后的 DGGE 图谱均有一个明显的由于条带较多而微显模糊的区域 (条带 2~5 区域), 但收获水稻后该区域内的条带数量明显高于收获小麦后的, 条带信号强度和 Shannon 多样性指数 (如条带 4 和 5) 也高于收获小麦后的 (CK 和 N 除外), 充分说明水稻季土壤氨氧化细菌群落结构多样性高于小麦季的。

2.2.2 土壤氨氧化细菌 DGGE 图谱的聚类分析 为进一步了解不同季节和施肥处理对氨氧化细菌群落结构的影响, 利用聚类分析法 (UPGMA) 对不同施肥处理下的氨氧化细菌群落结构 DGGE 图谱进行分析。结果 (图 2) 看出, 小麦收获后和水稻收获后的土壤样品明显分为两大族群, 说明季节对土壤氨氧化细菌的影响大于施肥处理。每季作物收获后 6 个

土壤样品又分为两大族群, 其中 M 与 MNPK 为一族群, CK、N、NP 和 NPK 为另一族群, 说明施入外源有机物质可能改变土壤的氨氧化细菌群落结构, 而长期施入化肥对土壤的氨氧化细菌群落结构影响较小。在收获水稻和小麦后, 不同化肥处理对氨氧化细菌群落结构具有不同的影响, 收获水稻后, NP 和 NPK 为一族群, CK 和 N 分别为独立的族群; 而收获小麦后 NP 和 NPK 为一族群, CK 和 N 为另一族群。

2.2.3 氨氧化细菌 DGGE 条带的序列分析 对氨氧化细菌 DGGE 分离凝胶上的典型条带进行了切胶测序。各条带序列经 NCBI 数据库的 BLAST 比对分析, 并与 Genbank 中的已知序列构建系统发育树。结果 (图 3) 显示, 条带 1 和条带 2 分别与 β -变形菌

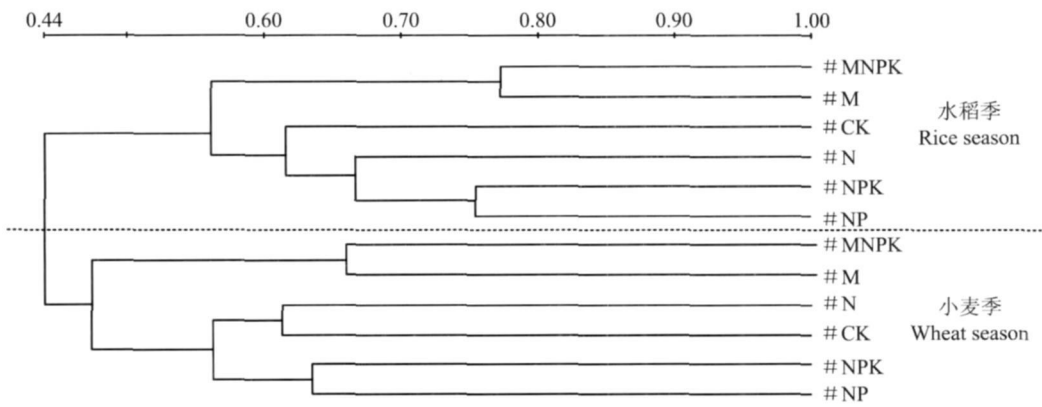


图2 黄棕壤性水稻土氨氧化细菌 DGGE 指纹图谱的聚类分析图

Fig.2 UPGMA analysis based on the DGGE profile of ammonium oxidizing bacterial after rice and wheat harvest under different fertilizer treatments

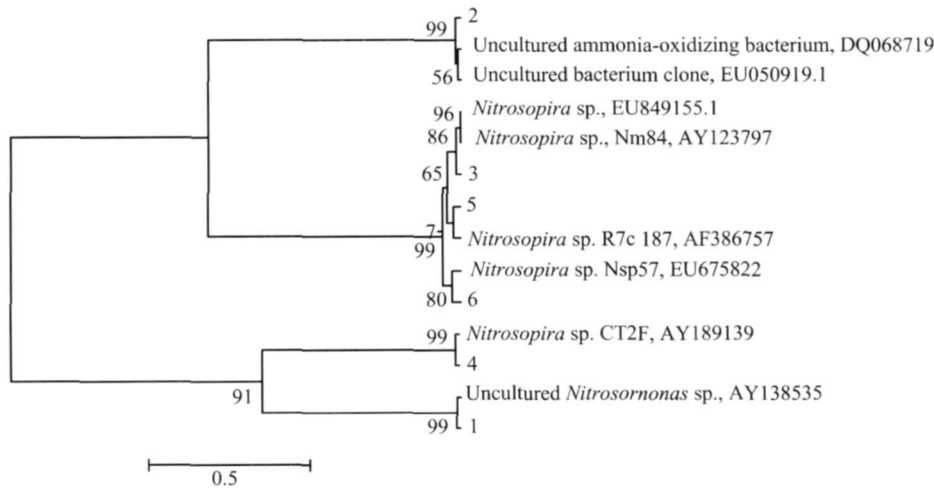


图3 氨氧化细菌 DGGE 图谱回收条带与参比序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on partial nucleotide sequences retrieved from the DGGE bands(bolds) of ammonium oxidizing bacterial in this study and in the DNA Genebank

纲 (*Proteobacteria*) 的未培养亚硝化单胞菌 (uncultured *Nitrosomonas* sp.) 和未培养氨氧化细菌 (uncultured ammonia-oxidizing bacterium) 相似性较高, 条带 3 和条带 5 与亚硝化单胞菌非常相似, 条带 4 和条带 6 与亚硝化螺旋菌 (*Nitrosopira* sp.) 相似性较高。

3 讨论

PCR-DGGE 技术是研究环境样品非 (难) 培养微生物的有效方法, 可以从土壤微生物基因组的角度揭示其多样性^[2], 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。在 DGGE 图谱中, 处于不同位置的每条 DNA 带及其相对浓度 (亮度) 可能代表微生物群落中某一特定微生物种及其在群落中的相对丰度^[9]。钟文辉等^[15]认为, 施入氮肥可提高红壤氨氧化细菌的 DGGE 条带数量; Gu

等^[14]、He 等^[16]和 Karin 等^[17]认为, 施用有机肥是影响土壤中氨氧化细菌群落结构变化的重要因素, 且氨氧化细菌群落结构变化在表征土壤物理特性变化方面比总细菌群落结构更为有效。本研究结果表明, 稻麦两季作物收获后, 不同施肥处理下土壤氨氧化细菌群落结构均明显不同。6 个施肥处理中黄棕壤性水稻土氨氧化细菌 DGGE 图谱的 Shannon 多样性指数和丰富度指数 (条带数量) 的变化特点依次为: 施用有机肥处理 > 化肥处理 > 不施肥的对照 (CK), 说明施用有机肥提高了黄棕壤性水稻土氨氧化细菌的多样性。这可能是施用有机肥促进了活性有机碳的积累, 进而提高了土壤微生物量碳和微生物量氮的含量, 改善了土壤微生物的生存环境^[5-6]。稻麦轮作是本研究区常用的作物种植方式。两种作物收获后土壤的氨氧化细菌 DGGE 图谱有较大

差异,且收获水稻后土壤氨氧化细菌多样性高于收获小麦后的;聚类分析结果也表明,两季作物收获后土壤氨氧化细菌 DGGE 图谱明显聚为两大组群,充分说明季节差异大于施肥处理间的差异。由于种植水稻和种植小麦的土壤环境条件有较大不同,最主要的原因可能是水稻季土壤水分明显高于小麦季;另外,由小麦季的氧化状况转变为水稻季的还原(嫌气)状况,两种作物分泌的代谢产物不同,对土壤中的氨氧化细菌具有选择性作用^[14]。聚类分析结果还显示,同一种作物收获后,6个施肥处理均被分为两大族群,其中 M 和 MNPK 聚为一个族群, N、NP、NPK 和 CK 聚为一族群,但后者族群内分类又不相同。这与 Gu 等^[14]长期施肥对石灰性紫色土氨氧化细菌 DGGE 图谱在小麦季上的分类相同;而水稻季 MNPK、NP 为一类,其余处理为另一类相差较大,可能与土壤类型、土壤肥力及气候环境等因素有关。

16S rDNA 基因序列的系统发育分析表明,所有的优势氨氧化细菌的系统发育都比较单一,与变形菌纲的 β -亚纲和 γ -亚纲的 16S rDNA 序列有较高的相似度。其中 β -亚纲的亚硝化细菌又分为亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas*)和亚硝化螺菌(*Nitrospira*)^[18]。钟文辉等^[15]对长期施肥对红壤氨氧化细菌 DGGE 图谱 16S rDNA 的条带测序结果表明,红壤上氨氧化细菌多属于亚硝化螺菌属,少数属于亚硝化单胞菌属。本研究中对 16S rDNA 条带的测序结果表明,所研究的黄棕壤性水稻土氨氧化细菌有两条 DNA 带与亚硝化单胞菌有较近的亲缘关系,两条 DNA 带与亚硝化螺菌有较近的亲缘关系。

参考文献:

- [1] Liu B, Gumpertz M L, Hu S J *et al*. Long-term effects of organic and synthetic soil fertility amendments on soil microbial communities and the development of southern blight [J]. *Soil Biol Biochem.*, 2007, 39: 2302–2316.
- [2] Bastia F, Zsolnay A, Hernández T *et al*. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective [J]. *Geoderma*, 2008, 147: 159–171.
- [3] Peacock A D, Mullen M D, Ringelberg D B *et al*. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications [J]. *Soil Biol Biochem.*, 2001, 33: 1011–1019.
- [4] Kaschuk G, Alberton O, Hungria M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability [J]. *Soil Biol Biochem.*, 2010, 42(1): 1–13.
- [5] Lovell R D, Jarvis S C, Bardgett R D. Soil microbial biomass and activity in long-term grassland: effects of management changes [J]. *Soil Biol Biochem.*, 1995, 27: 969–975.
- [6] Bêhm e L, Langer Bêhm e F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field

- experiments [J]. *Agric, Ecosyst Environ.*, 2005, 109: 141–152.
- [7] Muyzer G, De Walle C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol.*, 1993, 59: 695–700.
- [8] 李娟. 长期不同施肥制度土壤微生物学特性及其季节变化 [D]. 北京: 中国农业科学院博士论文, 2007.
- Li J. Studies on soil microbial properties and their seasonal variations of different long-term fertilization regimes [D]. Beijing PhD dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007.
- [9] Kuntal M H, Anand S, Mishra B *et al*. Impact of long-term application of fertilizer, manure and lime under intensive cropping on physical properties and organic carbon content of an Alfisol [J]. *Geoderma*, 2008, 148: 173–179.
- [10] Ge Y, Zhang J B, Zhang L M *et al*. Long-term fertilization regimes affect bacterial community structure and diversity of an agricultural soil in northern China [J]. *J Soils Sedim.*, 2008, 8: 43–50.
- [11] Oved T, Shaviv A, Goldrath T *et al*. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil [J]. *Appl Environ Microbiol.*, 2001, 67(8): 3426–3433.
- [12] Konneke M, Bernhard A E, de la Torre J R *et al*. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon [J]. *Nature*, 2005, 437: 543–546.
- [13] Zhang P, Zheng J, Pan G *et al*. Changes in microbial community structure and function within particle size fractions of a paddy soil under different long-term fertilization treatments from the Tai Lake region, China [J]. *Coll Surf B Bioint.*, 2007, 58: 264–270.
- [14] Gu Y F, Zhang X P, Tu S H *et al*. Soil microbial biomass, crop yields and bacterial community structure as affected by long-term fertilizer treatments under wheat-rice cropping [J]. *Eur J Soil Biol.*, 2009, 44: 1–8.
- [15] 钟文辉, 蔡祖聪, 尹力初, 等. 种植水稻和长期施用无机肥对红壤氨氧化细菌多样性和硝化作用的影响 [J]. *土壤学报*, 2008, 45(11): 105–111.
- Zhong W H, Cai Z C, Yin L C *et al*. Effects of rice cultivation and long-term application of inorganic fertilizers on ammonia oxidizers diversity and nitrification of red soils [J]. *Acta Pedol Sin.*, 2008, 45(11): 105–111.
- [16] 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]. *J Soils Sedim.*, 2008, 8: 349–358.
- [17] Karin E, Karin N, Stefan B *et al*. Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil [J]. *Soil Biol Biochem.*, 2007, 39: 106–115.
- [18] Rueda O R. Nitrifying and denitrifying bacterial communities in the sediment and rhizosphere of a free water surface constructed wetland [D]. Girona PhD dissertation, universitat de girona, 2008.