

雷竹林土壤氨氧化微生物对不同肥料的响应

郭 帅^{1,2}, 徐秋芳^{1,2}, 沈振明³, 李松昊^{1,2}, 秦 华^{1,2}, 李永春^{1,2}

(1. 浙江农林大学 环境与资源学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江农林大学 浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室, 浙江 临安 311300; 3. 浙江临安市林业科技推广总站, 浙江 临安 311300)

摘要: 雷竹 *Phyllostachys violascens* 林冬季地表覆盖施肥为核心的集约经营技术被广泛应用, 冬季覆盖以及施肥处理必将对土壤氨氧化微生物群落结构产生影响。为揭示雷竹林覆盖和施肥等集约经营措施对土壤氨氧化微生物的影响, 进行了田间试验。设计如下 2 个试验: 试验 1 为施用等量硝态氮复合肥: $m(\text{氮}):m(\text{五氧化二磷}):m(\text{氯化钾})=16:16:16$ 的对照 1(不覆盖)和处理 1(覆盖); 试验 2 为覆盖的 4 个不同肥料处理, 分别为对照 2(不施肥), 处理 1, 处理 2(尿素), 处理 3(尿素+氯化钾), 各处理以含氮量 $360 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 为标准折算成相应的肥料用量, 氯化钾与复合肥等钾量折算。应用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术和定量 PCR 技术分析土壤氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)群落结构多样性和功能基因丰富度。结果表明: 不同处理土壤氨氧化细菌和氨氧化古菌有较高比例的共性种类, 群落结构尚未发生显著改变; 前期未覆盖的对照 1 与其他前期曾覆盖的所有处理的氨氧化细菌群落结构差异相对较明显, 同为前期覆盖的处理 3 与其他处理又稍有不同; 土壤氨氧化细菌多样性为处理 1 明显高于($P<0.05$)处理 3; 处理 3 氨氧化细菌和氨氧化古菌的基因的丰度均较高($P<0.05$)。综合比较不同处理氨氧化细菌和氨氧化古菌的 DGGE 条带的多样性以及定量分析得出结论, 处理 3 的氨氧化微生物多样性和功能基因最丰富, 处理 2 最差。建议生产上采用尿素与氯化钾搭配施用, 有利于土壤氨氧化微生物的活动和氮素循环利用。图 3 表 2 参 28

关键词: 森林土壤学; 雷竹林; 冬季覆盖; 施肥; 氨氧化古菌; 氨氧化细菌; 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S714.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2014)03-0343-09

Response of soil ammonia-oxidizing organisms on fertilization and mulch in *Phyllostachys violascens* stands

GUO Shuai^{1,2}, XU Qiufang^{1,2}, SHEN Zhenming³, LI Songhao^{1,2}, QIN Hua^{1,2}, LI Yongchun^{1,2}

(1. School of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China;

2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems and Carbon Sequestration, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 3. Forest Technology Service General Station of Lin'an City, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: For intensive management of *Phyllostachys violascens* stands, heavy winter mulching, to increase soil temperature, and winter fertilization are widely used techniques which affect the activity of soil ammonia oxidizing organisms. To understand the effects of mulch and fertilization on ammonia oxidizing bacteria (AOB) and ammonia oxidizing archaea (AOA) communities, two experiments were conducted: 1) with a constant N fertilizer rate of $360 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ applied as $m(\text{N}):m(\text{P}_2\text{O}_5):m(\text{K}_2\text{O})=16:16:16$ and treatments (Tr) with mulch (Tr1) and no mulch (ck1); and 2) with mulch in each treatment and ck, three fertilizer combinations

收稿日期: 2013-03-22; 修回日期: 2013-04-23

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y3100578); 浙江省创新团队资助项目(2010R50030)

作者简介: 郭帅, 从事土壤生物与生物化学研究。E-mail: changeyihao2008@126.com。通信作者: 徐秋芳, 教授, 博士, 博士生导师, 从事森林土壤微生物与生物化学研究。E-mail: xuqiufang@zafu.edu.cn

at a constant N rate of $360 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ [Tr1 (as above)—applied as a compound fertilizer, Treatment 2 (Tr2)—applied N as urea, Treatment 3 (Tr3)—applied fertilizer as urea and potassium chloride (KCl), and ck2—no fertilizer applied]. The community structure and functional gene abundance of soil AOB and AOA were measured using polymerase chain reaction—denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and real-time—polymerase chain reaction (RT-PCR) with the Shannon diversity index being used for analysis. Results showed a majority of common AOB and AOA species represented by bands on DEEG profile were produced from the all treatments. The AOB community structure with no mulch (ck1) was different from the other treatments which received mulch in the winter season, and Tr3 was different from the other mulched treatments. The Shannon diversity index for AOB species with Tr1 was significantly higher ($P < 0.05$) than Tr3. The higher ($P < 0.05$) *amoA* abundance for both AOB and AOA was observed in Tr3. Results from the combination of PCR-DGGE and RT-PCR for both AOA and AOB, showed Tr3 best in species diversity and gene abundance of ammonia oxidizing organisms; whereas, Tr2 was worst. Thus, to sustain the activity of ammonia oxidizing organisms and to improve N recycling, urea in combination with KCl should be applied. [Ch, 3 fig. 2 tab. 28 ref.]

Key words: forest soil science; *Phyllostachys violascens* plantation; winter mulching; fertilization; ammonia oxidizing archaea (AOA); ammonia oxidizing bacteria (AOB); PCR-DGGE; real-time quantitative PCR

20 世纪后期, 用土壤微生物数量、土壤酶等生物指标来表征土壤品质及土壤微生物多样性曾受到广泛关注^[1-2]。土壤微生物多样性代表着土壤微生物群落结构的稳定性, 同时也反映土壤胁迫和土壤生态机制对群落的影响, 因此, 土壤微生物是土壤可持续利用的重要指标^[3]。硝化作用的微生物代谢包括氨氧化作用和亚硝化作用 2 个过程, 分别由氨氧化细菌(ammonia oxidizing bacteria, AOB), 氨氧化古菌(ammonia oxidizing archaea, AOA)和亚硝酸盐氧化菌催化进行, 其中由铵盐氧化成亚硝酸盐的第 1 步过程是硝化作用的限速步骤, 与土壤氮素循环密切相关, 硝化细菌将氨或者铵盐氧化为硝酸盐, 增加了土壤中氮元素移动性, 对喜硝酸盐植物有利, 但同时也增加了土壤中氮素淋失、反硝化作用还原成氮气, 从而增加了土壤中氮素损失的风险, 对农业生产不利^[4-6]。有研究认为, 基于氨氧化细菌和氨氧化古菌生态位的不同和它们在土壤生态系统大尺度范围内对环境变化的敏感性, 氨氧化细菌和氨氧化古菌可以作为土壤检测有效的生物学指标^[7]。研究发现, 氨氧化微生物的群落结构和多样性受多种环境因子的影响, 主要包括氨态氮^[8]和氧气^[9]、环境 pH 值^[10-11]、温度^[12-13]、底物浓度等。因此, 研究不同施肥制度下土壤氨氧化微生物的多样性, 可为土壤环境质量的变化提供重要依据^[14]。Zhang 等^[15]研究了长期施肥对太湖流域水稻土细菌群落结构的影响。Chu 等^[16]研究施肥对砂质壤土中氨氧化细菌多样性的影响发现, 施用氮肥土壤 *amoA* 基因的多样性高于不施氮肥的土壤。而 Colloff 等^[17]的研究显示, 施用尿素的土壤中 *amoA* 基因的多样性未见增长。贺纪正等^[18]应用实时荧光定量核酸扩增检测系统(qPCR), 克隆和测序多方法综合研究发现, 红壤旱地长期氮磷钾复合肥、以及氮磷钾与有机肥配合施肥能显著提高氨氧化古菌和细菌的 *amoA* 功能基因数量, 而单施氮肥则反而降低了功能基因的数量, 不同施肥土壤氨氧化细菌群落结构没有显明差异, 但对氨氧化古菌的群落结构组成产生明显的影响。雷竹 *Phyllostachys violascens* 林由于具有产量高、成林快、出笋早、笋味鲜的特点, 目前, 在长江以南各省均有栽培, 特别是 20 世纪 80 年代推广以冬季地表增温覆盖和施肥为核心的反季节集约栽培技术以来, 因为经济效益高, 集约栽培面积不断扩大, 竹农对雷竹经营强度不断加大, 超过一般农作物。集约经营雷竹林土壤有机质急剧增加^[19], 为土壤微生物的活动提供大量能源和碳源。雷竹林大量施用化学氮肥的经营方式对土壤氮循环相关微生物的影响则更突出, 氮循环相关微生物的变化反过来影响土壤氮素循环和氮素的利用率。为了探究不同肥料施用后短期内对土壤氨氧化微生物的影响, 在施肥后 1 周采集土壤样品并分析土壤氨氧化古菌和氨氧化细菌群落结构, 揭示大剂量施肥后土壤氨氧化微生物的快速响应。

1 研究地区与分析方法

1.1 研究地概况

研究区位于浙江省临安市, $30^{\circ}14'N$, $119^{\circ}42'E$, 位于浙江省西北部, 属中亚热带季风气候区, 全

年降水量为 1 628.6 mm，全年平均气温 16.4 ℃，全年日照时数 1 847.3 h。雷竹产区有粗放经营和集约经营 2 种管理模式，前者施肥量小，且冬季不覆盖，全年总用量为 2 250 kg·hm⁻² 硝态氮复合肥[*m*(氮):*m*(五氧化二磷):*m*(氧化钾)=16:16:16，折合纯氮为 360 kg]，分别在每年的 5 月和 9 月份施肥，2 次比例为 60%和 40%，每年 4 月时采收自然笋。而集约雷竹林冬季覆盖大量的有机物料以提高土温度，全年施肥量是粗放经营的 2 倍，施肥 3 次·a⁻¹，分别在 5 月上旬、9 月中下旬和 11 月底覆盖以前，3 次施肥量比例控制在 35%，30%和 35%。本试验选择成林时间为 15 a 的长期粗放经营雷竹林作为试验地，2010 年 12 月进行首次冬季覆盖经营，6 月将覆盖物翻入土壤。

1.2 试验设计

在临安市板桥镇雷竹林地，按照雷竹集约经营要求于 2010 年 12 月 7 日进行冬季(第 1 次)施肥，翌日覆盖竹叶；2011 年 6 月 20 日，揭去部分覆盖物后将剩余的竹叶翻入土壤，10 d 后(6 月 30 日)进行春季(第 2 次)施肥，2 次的施肥方案相同(表 1)，为了比较覆盖与否对土壤氨氧化微生物的影响，增设了前期不覆盖的对照 1 与施肥相同但覆盖的处理 1 的比对试验(第 1 个试验)；覆盖后不同肥料处理对土壤氨氧化微生物的影响的试验为 4 个处理(第 2 个试验)，分别为对照 2(不施肥)，处理 1, 处理 2 和处理 3，施肥品种及用量见表 1，其中处理 1 为 2 个试验共用。各处理以含氮量 360 kg·hm⁻² 为标准折算成相应的肥料用量，重复 3 个·处理⁻¹，随机区组排列，共计 15 个小区，小区面积 5 m × 5 m。按表 1 中试验设计要求将肥料均匀地散施于地表再翻入 10 cm 土层。

表 1 各处理化肥品种、用量及田间排列顺序
Table 1 Design of the trial with different fertilizers and the order of treatments in field

处理	化肥组合	化肥用量/(kg·hm ⁻²)	前期施肥时覆盖物
对照 1	复合肥	2 250	无
处理 1	复合肥	2 250	竹叶
对照 2	不施肥	0	竹叶
处理 2	尿素	782.6	竹叶
处理 3	尿素+氯化钾	782.6+520.5	竹叶

说明：复合肥为硝态氮复合肥[*m*(氮):*m*(五氧化二磷):*m*(氧化钾)=16:16:16]；处理 2 尿素用量：与处理 1 等量氮折算；处理 3 尿素+氯化钾：含氮量、含钾量同处理 1，与处理 1 等氮和等钾量折算出尿素和氯化钾的用量。

1.3 土壤样品采集

2011 年 7 月 8 日(施肥后 7 d)，在每个小区用土钻多点随机采集表层 0~20 cm 土壤样品，混匀装入无菌密封袋，放入事先准备好的冰盒带回实验室。新鲜土壤充分混匀后，去除石块和动植物残体，过 2 mm 钢筛。样品存放于-70 ℃冰箱内，待冷冻干燥后用于土壤细菌总 DNA 的提取，供土壤氨氧化细菌和氨氧化古菌(AOA)群落结构及定量分析，剩余的样品存放于-20 ℃冰箱中保存以备后续分析。

1.4 主要试剂与引物

Power Soil TM Total DNA Isolation Kit 试剂盒购于美国 Mo Bio 公司，*Taq* DNA 聚合酶购于大连 TaKaRa 公司，定量聚合酶链式反应(PCR)试剂采用 Takara 公司的 SYBR Premix Ex TaqTM(Perfect Real Time)(TaKaRa Code: DRR041)，荧光染料 SYBR green I 购于美国 Invitrogen 公司，引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.5 分析方法

1.5.1 土壤总 DNA 的提取及纯化 采用 Power Soil TM Total DNA Isolation K 试剂盒提取土壤总 DNA，按试剂盒说明书操作，通过 10 g·kg⁻¹ 琼脂糖电泳对所提取 DNA 效果进行鉴定，提取的 DNA 保存于-40 ℃冰箱中。

1.5.2 土壤 DNA 的 PCR 扩增 以土壤总 DNA 为模板扩增氨氧化古菌氨单加氧酶基因 *amoA* 片段采用引物对 GC-Arch-*amoA*R 和 Arch-*amoA*F，Arc-*amoA*F：5'-STA ATGGTCTGGCTTAGACG-3'；GC-Arc-*amoA*R：5'- GCGGCCATCCATCTGATTGT-3'，扩增 AOB 氨单加氧酶基因 *amoA* 片段采用引物对 GC-*amoA*-1F 和 *amoA*-2R，GC-*amoA*-1F： 5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'；*amoA*-2R： 5'-CCCCTCGGGAAAGCCTTCTTC-

3'。使用 Bio-Rad 公司的 S1000TM Thermal Cycler PCR 仪对土壤 DNA 进行扩增。20.0 μL 反应体系如下: 预混合液 (premix) 10.0 μL , 引物 (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 各 0.2 μL , 牛血清白蛋白 (BSA) 0.2 μL , 模板 DNA 0.2 μL , 用无菌双蒸水补足至 20.0 μL 。PCR 反应参数: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取 3.0 μL PCR 反应产物用 10.0 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶进行电泳, 检测产物及其长度。

1.5.3 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 使用 DcodeTM Universal Mutation Detection System (Bio-Rad), AOB *amoA* 基因 PCR 产物检测是在在变性梯度为 40%~65% 的 60.0 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 聚丙烯酰胺凝胶上进行变性梯度凝胶电泳; 氨氧化古菌 *amoA* 基因 PCR 产物检测是在在变性梯度为 22.5%~42.5% 的 60 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 聚丙烯酰胺凝胶上进行变性梯度凝胶电泳。电泳前对 PCR 产物定量、校正, 使上样量一致。在 60 $^{\circ}\text{C}$, 80 V 条件下电泳 13.5 h 后, 用 Gel red 染料染色 30 min, 染色结束后用 GelDocTM EQ (Bio-Rad) 凝胶成像系统成像, 使用 Quantity One 4.4 软件 (Bio-Rad) 进行图像分析。

1.5.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 使用 CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad) 仪器进行氨氧化古菌和氨氧化细菌的功能基因的实时定量分析, 进而确定样品的原始拷贝数。氨氧化细菌和氨氧化古菌功能基因定量引物序列分别为: *amoA*-1F: 5'-ggggTTTCTACTggTggT-3' *amoA*-2R: 5'-CCCCTCgggAAAgC-CTTCTTC-3' Arch-*amoA*F: 5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3' Arch-*amoA*R: 5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3'。20 μL 反应体系如下: SYBR Premix Ex TaqTM 10.0 μL , 引物 (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 0.2 μL , 模板 DNA 1.0 μL , 无菌双蒸水补足至 20.0 μL 。氨氧化古菌反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$, 3.0 min; 35 $\times$ (95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s 终点读板); 溶解曲线 65.0 ~ 95.0 $^{\circ}\text{C}$, 增量 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 0: 05+终点读板。氨氧化细菌反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$, 3.0 min; 38 $\times$ (95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s 终点读板); 溶解曲线 65.0 ~ 95.0 $^{\circ}\text{C}$, 增量 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 0: 05+终点读板。样品 DNA 浓度与拷贝数之间的转化公式: 摩尔数 $M = \text{DNA 质量浓度} (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}) / (\text{重组质粒片段长度} \times 324.5 \times 2)$, $N_c = 6.02 \times 10^{23} \times M$ 。

1.5.5 数据分析 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理, Duncan 单因素方差分析比较各处理之间的差异显著性 ($P < 0.05$)。采用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 4.4 进行 DGGE 指纹图谱分析。用 Quantity One 软件进行 Shannon 多样性指数 (H) 和 Pielou 均匀度指数 (E_H) 的计算和聚类分析, 其中聚类分析用非加权

组平均法 (UPGMA)。计算公式如下: $H = -\sum (n_i/N) \ln(n_i/N)$, $E_H = H/\ln S$ 。其中: n_i 为单一条带的强度, N 为所有条带的总强度; S 为每一泳道总的条带数。

2 结果与分析

2.1 雷竹林土壤氨氧化细菌群落结构及多样性分析

2.1.1 土壤氨氧化细菌微生物群落变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 图谱分析 应用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术对 PCR 产物进行分离, 通过指纹图谱可以清楚看到分离为若干条带 (图 1A), 不同处理的土壤样品显示出不同的条带类型, 对 DGGE 图谱进行统计发现: 不同处理土壤在 DGGE 图谱中电泳条带的数目、亮度、迁移的位置均存在一定程度的差异。在 DGGE 图谱上, 处于不同位置的 DNA 条带及其相对浓度 (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^[20]。通过分析 DGGE 图谱发现所有的土壤样品共有 31 条位置不同的条带, 比本地阔叶林、杉木 *Cunninghamia lanceolata* 林^[21-22]等土壤少, 但比旱地农田^[18]和水稻土壤^[23]则多。不同土壤样品间共同条带 17 条, 占条带总类型的 54.8%, 但这些共性条带的亮度不同; 此外, 还有不少条带 (6, 10, 12, 13, 23, 24, 26, 30) 是大多数样品的共有条带, 说明不同施肥处理土壤有较高比例的共性氨氧化细菌种类, 其中半数以上氨氧化细菌的物种完全相同, 只是丰度不同。与总体较高比例共性条带形成显明对照的是, 虽然同一处理不同重复之间条带位置基本一致, 但亮度上有明显差异, 特别是处理 1 和处理 3。可能的原因有二: 其一是因为田间试验时的肥料以固体撒施的方法进行, 无法达到完全均匀; 其二是用于 DNA 提取的土壤样品量太少 (0.3 g), 样品的代表性受到影响, 虽然是多点的混合样品, 但新鲜土壤不能像风干土那样混合充分。不同处理间的差异情况, 平均条带由高到低的顺序依次是: 对照 2 (29 条) > 处理 2 (28 条) > 处理 1 (25 条) > 对照 1 (23 条) > 处理 3 (22 条)。对照 1 的条带模式与其他处理的差异更明显, 其中 22 号条带

亮度特别强，30 号条带亮度是对照 1 的特色条带，而其他条带则不如其他处理强，说明前期覆盖以及后期竹叶翻入土壤的大量有机物质对氨氧化细菌的影响。对照 1 和处理 1 施用同样的含有硝态氮的复合肥，条带模式明显不同。前期覆盖的处理 1 条带数多于未覆盖的对照 1，说明前期覆盖以及覆盖物翻入土壤对土壤氨氧化细菌有影响，但发现两者有 1 条(条带 29)共性条带比其他施肥处理的亮，可能是复合肥的作用结果。处理 3 的条带数比其他处理少，可能与氯化钾中氯离子对微生物的抑制作用所致。Shannon 指数反映了群落中物种的变化度或差异度，受样本总数和均匀度的影响，一般来说，物种丰富度高且分布较均匀的群落的 Shannon 指数较高^[24]。Shannon 多样性指数由高到低的顺序依次是：对照 2>处理 2>处理 1>对照 1>处理 3(表 2)，不同处理间氨氧化细菌多样性指数差异性显著($P<0.05$)，而施用复合肥的均匀度指数(E_H)也明显高于尿素处理(表 2)。

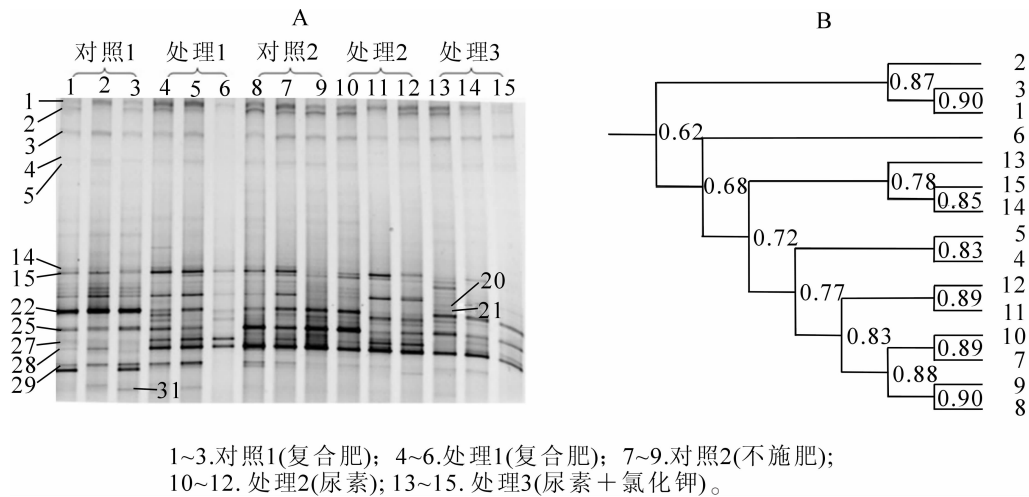


图 1 土壤样品氨氧化细菌 *amoA* 基因扩增片段的 DGGE 分析结果(A)以及 DGGE 条带图谱的聚类分析(B)
Figure 1 DGGE analytical result and cluster analysis of *amoA* fragment of ammonia-oxidizing bacterial communities from the soil samples

表 2 不同施肥土壤氨氧化细菌和氨氧化古菌的多样性

处理	氨氧化细菌		氨氧化古菌	
	Shannon 指数 H	均匀度指数 E_H	Shannon 指数 H	均匀度指数 E_H
对照 1	3.103 d	0.990 a	2.905 ab	0.993 a
处理 1	3.162 c	0.990 a	2.722 c	0.984 ab
对照 2	3.308 a	0.986 b	2.816 bc	0.991 ab
处理 2	3.260 b	0.986 b	2.823 bc	0.977 b
处理 3	3.048 e	0.991 a	3.036 a	0.982 ab

说明：同列不同字母代表差异达显著水平 ($P<0.05$)。

2.1.2 土壤氨氧化细菌的 DGGE 图谱聚类分析 聚类分析可了解不同处理对氨氧化细菌群落结构的定量影响。利用聚类分析非加权组平均法(UPGMA)对不同施肥处理下的氨氧化细菌群落结构 DGGE 图谱进行分析得图 1B。土壤样品明显分为两大组：对照 1 单独为一组，其他处理为另一组，但相似度值略大于临界值 0.6，说明前期覆盖对土壤氨氧化细菌的影响大于施肥处理，但结构没有发生显著变化。所有前期覆盖处理的土壤样品，除了异常的处理 1，处理 2 和处理 3 外又分为 2 组，其中处理 3(尿素+氯化钾)为一组，进一步证明处理 3 施入氯化钾中的氯元素对土壤的氨氧化细菌群落结构有一定影响。以上结果分析表明，覆盖和不同肥料的集约经营措施在短期内能降低氨氧化细菌的多样性，改变土壤氨氧化细菌的群落结构，但变化幅度尚未超出相似度临界值 0.6，如长期采用覆盖措施并施用同样的肥料，则土壤氨氧化细菌的群落结构可能发生明显改变；施用复合肥(处理 1)的土壤氨氧化细菌丰富度显著大于($P<0.05$)尿素与氯化钾混合施肥(处理 3)，施用复合肥对维持土壤氨氧化细菌的群落多样性有一定好处。

2.2 雷竹林土壤氨氧化古菌群落结构及多样性分析

2.2.1 长期施肥氨氧化古菌微生物群落 DGGE 图谱分析 应用 DGGE 技术对雷竹林土壤氨氧化古菌能基因 *amoA* 的 PCR 产物进行分离。所有的土壤样品共有 26 条位置不同的条带(图 2A)，比相同土壤样品的氨氧化细菌条带数少，而宋亚娜等^[23]在水稻土中检测到的氨氧化古菌种类明显多于氨氧化细菌种类。所有处理 DGGE 条带的位置基本相同，但不同处理条带的亮度有差异，处理 3 的 3 个重复有很好的一致性，且条带亮度大，其中条带 1 明显比其他处理亮、而条带 20 则明显弱于其他处理外，其他位置的条带没有显示处理间的规律性差异，相反重复间差异大于处理间。用于氨氧化古菌与氨氧化细菌扩增的为同一 DNA 提取液，不同重复间氨氧化古菌的差异明显大于氨氧化细菌，说明土壤氨氧化古菌对高浓度肥料比氨氧化细菌敏感，然而尿素+氯化钾对氨氧化古菌则没有不利影响。其他研究报道：氨氧化古菌比氨氧化细菌受施肥、植被及土壤 pH 值等环境影响较小^[21,25]。可能的解释是，氨氧化古菌比氨氧化细菌在一定范围内受环境影响小于氨氧化细菌，但大量施肥这种强度干扰对氨氧化古菌的影响反而大于氨氧化细菌，当然这只是推测，确切的结果必须通过进一步的培养实验来证实。不同处理之间氨氧化古菌物种的差异不大，但 Shannon 多样性指数(Shannon index)从平均值看，对照 1(前期未覆盖+复合肥)大于处理 1(前期覆盖+复合肥)，说明前期覆盖及大量的竹叶翻入土壤可能会降低雷竹林地氨氧化古菌的物种多样性。雷竹林去掉覆盖物后不同施肥处理间 Shannon 多样性指数由高到低的顺序依次是：处理 3>处理 2>对照 2>处理 1，由此可以看出，施加尿素态氮肥能够增加土壤中氨氧化古菌的种群丰富度，但是处理 1 的复合肥是含硝态氮的复合肥，而处理 2 和处理 3 所含的是铵态氮的氮肥。均匀度指数(E_H)对照 1 最高，处理 2 最低，其他处理之间则没差异(表 2)。土壤氨氧化古菌对覆盖和不同肥料的反应正好与氨氧化细菌相反。

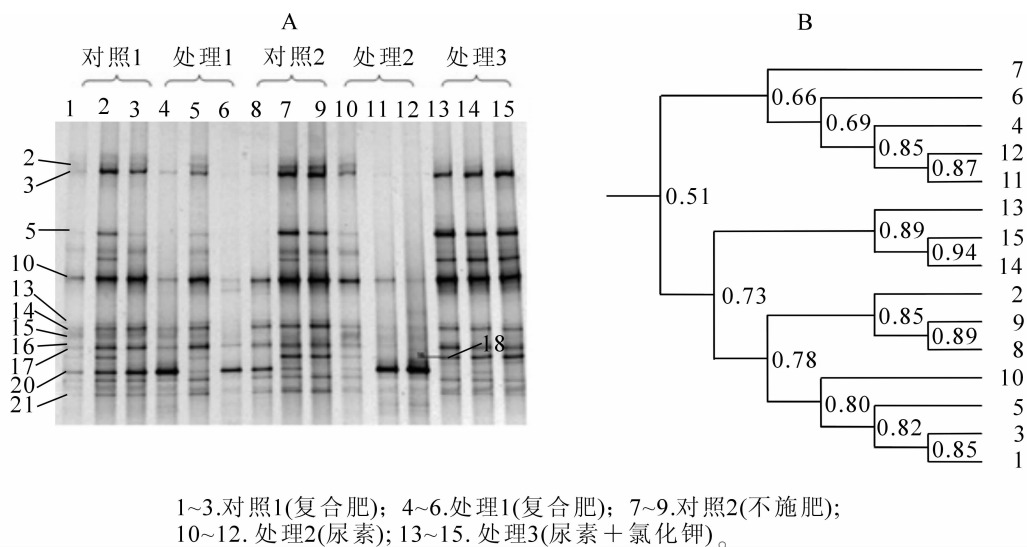


图 2 土壤样品氨氧化古菌 *amoA* 基因扩增片段的 DGGE 分析结果(A)以及 DGGE 条带图谱的聚类分析(B)

Figure 2 DGGE analytical result and cluster analysis of *amoA* fragment of ammonia-oxidizing archaea communities from the soil samples

2.2.2 土壤氨氧化古菌的 DGGE 图谱聚类分析 为进一步了解施肥处理对氨氧化古菌群落结构的影响，利用聚类分析非加权组平均法(UPGMA)对不同施肥处理下的氨氧化古菌群落结构 DGGE 图谱进行分析。观察结果(图 2B)得出，所有样品分为 2 组，上面一组为不同处理中出现异常低的样品(4, 6, 7, 11, 12)，其余样品聚为一类的相似值为 0.73，说明不同处理间结构相似度较高，不同肥料对氨氧化古菌群落结构组成影响较氨氧化细菌小。以上结果分析表明，不同施肥处理土壤氨氧化古菌的群落结构变化也不大，大部分样品群落的相似度为 0.73，不同处理间氨氧化古菌物种没有差异，但丰度差异较大，其中处理 3 土壤氨氧化古菌结构多样性显著高于处理 1($P<0.05$)。

2.3 雷竹林土壤氨氧化细菌和氨氧化古菌 *amoA* 基因定量分析

通过 *amoA* 基因的拷贝数可以分别估算氨氧化细菌和氨氧化古菌的丰富度，应用 Real-Time PCR 技

术获得各样品起始拷贝数换算出每克干土的氨氧化古菌和氨氧化细菌的 *amoA* 基因拷贝数 (N_c , 图 3), 氨氧化细菌的 *amoA* 基因拷贝数最多的是处理 3 (干土拷贝数 $4.47 \times 10^7 \cdot g^{-1}$), 其他依次为对照 2, 处理 2 和处理 1, 对照 1 最少, 其中处理 3 土壤氨氧化细菌的 *amoA* 基因拷贝数要显著高于 ($P < 0.05$) 对照 1, 是对照 1 的 2.50 倍, 而与其他的处理之间没有显著性差异。不同处理土壤的氨氧化古菌除处理 3 外没有显著差异。不同样品的定量分析结果与 DGGE 图中条带数量与强度基本一致, 条带多亮度大则基因拷贝数多, 然而也有例外的情况, 氨氧化细菌的处理 3 条带数明显少于其他处理, 但拷贝数反而最高, 处理 2 的氨氧化古菌的条带数明显比其他样品少, 但基因拷贝数的差异则没有条带明显, 以上情况说明, 有些条带因为浓度低不能在 DGGE 上显示出来, PCR-DGGE 通常只能检测到微生物群落中数量上大于 1% 的优势种群^[26], 但定量分析则可以检测到所有基因片段, 因此定量分析能更准确地反应基因的丰度。处理 3 的氨氧化古菌和氨氧化细菌基因拷贝均为最高, 而且重复间的差异也最小, 说明施肥后虽然部分种类的氨氧化细菌被弱化, 不能在 DGGE 图上显示, 但从功能基因数量角度看尿素+氯化钾施用后没有产生不良影响。

不同处理的土氨氧化古菌与氨氧化细菌 *amoA* 基因拷贝数的比值 (N_{cAOA}/N_{cAOB}) 范围为 1.18~2.70。前期覆盖的 4 个处理中处理 3 最高, 与贺纪正等^[18]对酸性红壤长期施肥定位试验地不同处理的氨氧化细菌和氨氧化古菌研究一致, N_{cAOA}/N_{cAOB} 比值最高的是处理 3 (7.47), 其他处理均低于对照, 即使是施用有机肥, 说明施肥降低了 N_{cAOA}/N_{cAOB} 的比值, 改变了氨氧化细菌和氨氧化古菌的组成和结构。土壤氨氧化细菌和氨氧化古菌的组成受土壤 pH 值、施肥和土地利用、土壤类型^[27]等因素的影响, 碱性土壤 N_{cAOA}/N_{cAOB} 比值大于酸性土壤^[25]。在不施肥的自然森林土壤中, 许多因素如土壤 pH 值、有效磷、微生物量碳、硝酸盐和总氮可能影响氨氧化微生物的组成, 养分丰富、pH 值中性则 *amoA* 基因拷贝数多^[28]。而对于大量施肥的土壤, 养分水平总体很高, 小幅变化则不会引起土壤氨氧化微生物结构的改变。本试验中, 2 次大量施肥使土壤养分水平处于过高状态, 因此影响功能基因丰度的因素是肥料品种及组合方式而非养分水平。结合比较不同处理氨氧化细菌和氨氧化古菌的 DGGE 条带数和定量分析数据发现, 对强度经营的雷竹林土壤要维持较好的土壤硝化功能和氮素循环, 建议采用处理 3 的肥料搭配。

3 结论

不同施肥处理土壤有较高比例的共性氨氧化细菌种类, 群落结构尚未发生明显改变; 前期未覆盖的对照 1 与其他前期曾覆盖的所有处理的氨氧化细菌群落结构差异较明显, 同为前期覆盖的处理 3 与其他处理又稍有不同; 处理 1 土壤的氨氧化细菌多样性显著高于处理 3 ($P < 0.05$), 而基因的丰度则处理 3 最高。不同施肥处理土壤氨氧化古菌的群落结构变化不大, 除去处理 1, 对照 2 和处理 2 中的异常样品后, 群落的相似度高达 0.73; 处理 3 与其他处理有 2 个条带亮度存在明显差异, 其余处理间条带则没有差异, 但丰度的差异较大。处理 3 土壤氨氧化古菌结构多样性显著高于处理 1 ($P < 0.05$), 基因的丰度也是处理 3 最高。综合比较不同处理氨氧化细菌和氨氧化古菌的 DGGE 条带的多样性以及定量分析得出结论, 处理 3 的氨氧化微生物多样性和功能基因最丰富, 处理 2 最差。建议生产上采用尿素与氯化钾搭配施用, 有利于土壤氨氧化微生物的活动和氮素循环利用。

参考文献:

- [1] LOVELL R D, JARVIS S C, BARDGETT R D. Soil microbial biomass and activity in long-term grassland: effects of

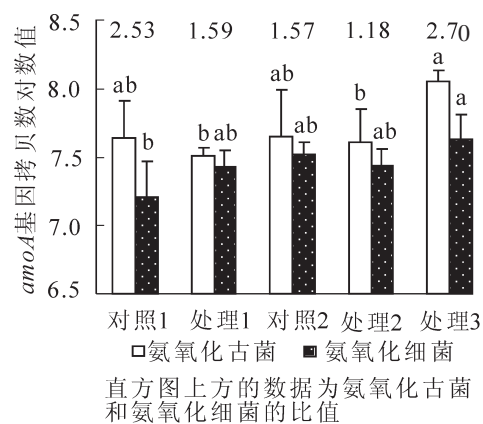


图 3 不同处理下氨氧化古菌 *amoA* 基因和氨氧化细菌 *amoA* 基因的丰富度

Figure 3 Abundance of ammonia oxidizing bacterial *amoA* genes and ammonia oxidizing archaeal *amoA* genes under different treatments

- management changes [J]. *Soil Biol Biochem*, 1995, **27**: 969 – 975.
- [2] BÖHME L, LANGER U, BÖHME F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments [J]. *Agric Ecosyst Environ*, 2005, **109**: 141 – 152.
- [3] BRUSSAARD L, DE RUITER P C, BROWN G G. Soil biodiversity for agricultural sustainability[J]. *Agric, Ecosyst Environ*, 2007, **121**(3): 233 – 244.
- [4] LEININGER S, URICH T, SCHLOTTER M, *et al.* Archaea predominate among ammonia oxidizing prokaryotes in soils [J]. *Nature*, 2006, **442**: 806 – 809.
- [5] PROSSER J I, NICOL G W. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment [J]. *Environ Microbiol*, 2008, **10**: 2931 – 2941.
- [6] KOWALCHUK G A, STEPHEN J R. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology [J]. *Ann Rev Microbiol*, 2001, **55**(1): 485 – 529.
- [7] WESSÉN E, HALLIN S. Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers-possible bioindicator for soil monitoring [J]. *Ecol Indic*, 2011, **11**: 1696 – 1698.
- [8] OKANO Y, HRISTOVA K R. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 1008 – 1016.
- [9] JENSEN K, SLOTH N P. Estimation of nitrification and denitrification from microp rofiles of oxygen and nitrate in model sediment systems [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 2094 – 2100.
- [10] FRIJLINK M J, ABEE T, LAANBROCK H J. The bioenergetics of ammonia and hydroxylamine oxidation in nitrosomonas europaea by altering pH to affect NH₃ availability [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4588 – 4592.
- [11] BURTON S, PROSSER J I. Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis [J]. *Soil Biochem*, 1998, **30**: 509 – 515.
- [12] FIERER N, CARNEY K M, HORNER-DEVINE M C, *et al.* The biogeography of ammonia-oxidizing bacterial communities in soil [J]. *Microbial Ecol*, 2009, **58**: 435 – 445.
- [13] SUNDBERG C, STENDAHL J S K, TONDERSKI K. Over land flow systems for treatment of landfill leachates: Potential nitrification and structure of the ammonia-oxidising bacterial community during a growing season[J]. *Soil Biol Biochem*, 2007, **39**: 127 – 138.
- [14] 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 Jizheng, ZHANG Limei. Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle [J]. *Acta Ecol Sin*, 2009, **29**(1): 406 – 415.
- [15] ZHANG Pingjiu, ZHENG Jufeng, PAN Genxing *et al.* Changes in microbial community structure and function with in 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.
- [16] 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]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(2): 485 – 491.
- [17] COLLOFF M J, WAKELIN S A, GOMEZ D, *et al.* Detection of nitrogen cycle genes in soils for measuring the effects of changes in land use and management [J]. *Soil Biol Biochem*, 2008, **40**(7): 1637 – 1645.
- [18] HE Jizheng, SHEN Jupei, ZHANG Limei, *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]. *Environ Microbiol*, 2007, **9**: 2364 – 2374.
- [19] 姜培坤, 周国模, 徐秋芳. 雷竹高效栽培措施对土壤碳库的影响[J]. 林业科学, 2002, **38**(6): 6 – 11.
JIANG Peikun, ZHOU Guomo, XU Qiufang. Effect of intensive cultivation on the carbon pool of soil in *Phyllostachys praecox* stands [J]. *Sci Silv Sin*, 2002, **38**(6): 6 – 11.
- [20] 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.
- [21] 刘卜榕. 亚热带4种主要森林土壤氨氧化微生物群落结构及多样性研究[D]. 临安: 浙江农林大学, 2012.
LIU Burong. *Community and Diversity of Ammonia-oxidizing Microbes in Four Major Types of Forest in Subtropics of*

- China [D]. Lin'an: Zhejiang A & F University, 2012.
- [22] 田甜. 毛竹林土壤氨氧化微生物功能基因多样性[D]. 临安: 浙江农林大学, 2011.
- TIAN Tian. *Functional Gene Diversity of Ammonia-oxidizing Microbes of Soil in Phyllostachys pubescens* [D]. Lin'an: Zhejiang A & F University, 2011.
- [23] 宋亚娜, 林智敏, 林捷. 不同品种水稻土壤氨氧化细菌和氨氧化古菌群落结构组成[J]. 中国生态农业学报, 2009, **17**(6): 1211 – 1215.
- SONG Yana, LIN Zhimin, LIN Jie. Composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities in paddy soils of different rice cultivars [J]. *Chin J Eco-Agric*, 2009, **17**(6): 1211 – 1215.
- [24] MAGURRAN A E. *Ecological Diversity and Its Measurement* [M]. Princeton: Princeton University Press, 1988.
- [25] SHEN Jupei, ZHANG Limei, ZHU Yongguan, *et al.* Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam [J]. *Environ Microbiol*, 2008, **10**(6): 1601 – 1611.
- [26] VALLAEYS T, TOPP E, MUYZER G, *et al.* Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1997, **24**(3): 279 – 285.
- [27] GIRVAN M S, BULLIMORE J, PRETTY J N, *et al.* Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 1800 – 1809.
- [28] HAYDEN H L, DRAKE J, IMHOF M, *et al.* The abundance of nitrogen cycle genes *amoA* and *nifH* depends on land-uses and soil types in South-Eastern Australia [J]. *Soil Biol Biochem*, 2010, **42**: 1774 – 1783.