

变性梯度凝胶电泳法研究我国不同土壤 氨氧化细菌群落组成及活性

袁 飞, 冉 炜, 胡 江, 沈其荣*

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘要: 实验选用了我国 3 种不同土壤研究土壤硝化活性、硝化细菌数量, 并使用变性梯度凝胶电泳(DGGE)的方法研究了不同土壤中氨氧化细菌(AOB)区系变化。通过 28d 的土壤培养实验研究发现, 潮土具有最强的硝化势, 几乎 100% 的铵态氮转化为硝态氮; 而红壤中的硝化势最弱, 只有 4.9% 的铵态氮转化为硝态氮。对这 3 种土壤硝化细菌进行计数发现, 3 种土壤氨氧化菌数量差异显著, 而 3 种土壤亚硝酸氧化菌(NOB)处于一个数量级。采用氨氧化菌功能基因 amoA (氨单加氧酶 ammonia monooxygenase) 特异 PCR 结合 DGGE 的方法对土壤氨氧化菌区系进行分析。红壤有 4 个氨氧化菌种属, 与潮土和黄泥土没有共同的氨氧化菌种属。4 个种属中两个是与潮土和黄泥土亲源性比较远的, 特有的氨氧化菌种属, 这两个种属与已知的 *Nitrosospira* 属的 cluster3bz97838 和 *Nitrosospira* 属的 cluster3aAF353263 亲源性比较近。潮土有 5 个氨氧化菌种属, 潮土与黄泥土有两个共同的氨氧化菌种属, 这两个种属中的一个与潮土和黄泥土特有的, 与其他氨氧化菌种属亲源性比较远的氨氧化菌种属, 这个种属与已知的 *Nitrosospira* 属的 cluster 3b Z97849 亲源性比较近。黄泥土有 4 个氨氧化菌种属, 除了与潮土共有的一个种属是两种土壤特有的氨氧化菌种属外, 黄泥土还有一个与其他氨氧化菌种属亲源性比较远的, 黄泥土特有的种属, 与 *Nitrosospira* 属的 cluster 3a AF353263 亲源性很近。3 种土壤中分离到的硝化细菌表现出不同的硝化能力。实验结果表明, 以 amoA 基因为目标的 PCR-DGGE 是比以 16S rDNA 为目标的 PCR-DGGE 更有效的研究氨氧化菌种群的方法; 3 种土壤的氨氧化菌种群差异显著, 尤其是红壤的氨氧化菌种群与另外两种土壤差异明显, 这种差异可能与红壤的低 pH 条件对氨氧化菌种群的长期选择有关; 3 种土壤中的硝化活性与土壤中的硝化细菌数量没有显著相关, 可能由于 3 种土壤差异显著的土壤环境对硝化活性的影响造成。因此在对不同土壤硝化细菌进行研究时不仅需要对硝化细菌数量进行研究, 还需要研究不同土壤中硝化细菌的种属及不同土壤环境条件对硝化细菌硝化活性的影响。

关键词: 变性梯度凝胶电泳法; 土壤; 硝化活性; 氨氧化菌

文章编号: 1000-0933(2005)06-1318-07 中图分类号: S154.1, S154.37 文献标识码: A

Ammonia-oxidizing bacteria communities and their influence on the nitrification potential of Chinese soils measured by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

YUAN Fei, RAN Wei, HU Jiang, SHEN Qi-Rong* (College of Natural Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(6): 1318~1324.

Abstract: *Nitrification* is an important component of the global nitrogen cycle and the end-product is nitrate and the rate of nitrate production is very different among soil types. *Nitrification* can lead to different effects ranging from too much nitrate, causing environmental problems, or too little nitrate can lead to reduced crop yields. Differences in physical and chemical properties of soils are often well documented, but much less is known about the soil nitrifying bacterial communities. We

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40271098, 40471074)

收稿日期: 2004-03-23; 修订日期: 2004-09-19

作者简介: 袁飞 (1974~), 女, 江苏南通人, 博士, 主要从事土壤微生物研究。

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: shen qirong@njau.edu.cn

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 40271098, 40471074)

Received date: 2004-03-23; **Accepted date:** 2004-09-19

Biography: YUAN Fei, Ph. D., mainly engaged in microbiology in soil.

studied three soils of China to determine their soil nitrification activities, numbers of nitrifying bacteria, and the ammonia-oxidizing bacterial community. Maximum nitrification potential was found in Fluvoaquic soil with almost 100% of ammonium-N being transformed into nitrate-N after 28 days. Minimum nitrification potential was measured in the Red Earth soil with only a 4.9% conversion rate during the same time period. Numbers of ammonia-oxidizing bacteria, determined by the MPN-Griess method, were significantly different among the three soils. However, numbers of nitrite-oxidizing bacteria determined by the MPN-PCR method were similar. A PCR technique using the ammonia monooxygenase gene (*amoA*) combined with the new DNA fingerprinting technique, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), were used to analyze the composition of ammonia oxidizing bacteria in soils. DGGE analysis of the three soils were different from each other; there were 2 similar bands present in DGGE columns from the Fluvo-aquic soil and the Permeable paddy soil, but no similar bands were found in columns from Red Earth soil. Further study of the sequence of *amoA* indicated that there were differences of ammonia-oxidizing bacteria communities among the three soils. A phylogenetic tree including the *amoA* studied in this paper and *amoA* from other environments the database was established. There were four species of AOB found in Red Earth, both were different from the other two soils studied. Further comparison showed that these two species were closely related to *Nitrosospira* cluster 3b Z97838 and *Nitrosospira* cluster 3a AF353263, respectively. There were five species of AOB found in Fluvo-aquic soil and two of these were similar to those found in the Permeable paddy soil. Fluvo-aquic soil and Permeable paddy soil had a specific species which was closely related to *Nitrosospira* cluster 3b Z97849. There were four species of AOB found in Permeable paddy soil, and one of them was specific species for Permeable paddy soil and this was closely related to *Nitrosospira* cluster 3a AF353263. The nitrification activities of nitrifiers selected from these three soils were different. All the results obtained from this experiment implied that PCR-DGGE based on the *amoA* gene was a useful method to study AOB communities in soils. Each soil contained specific AOB species different from the others. Furthermore, the AOB of the Red Earth were particularly different from the other two soils, which might be related to the low pH of this soil. There was no relationship between the nitrification potential and nitrifying bacteria numbers of soils and this might be explained by the different physical properties of the soils.

Key words:denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); soil; nitrification activity; ammonia oxidizing bacteria

硝化作用影响环境中 NH_4^+ 和 NO_3^- 水平^[1]以及农田土壤的肥力水平^[2],研究不同土壤中硝化作用具有重要的农学意义和环境意义。硝化作用由两步反应组成,分别由氨氧化菌(AOB)和亚硝酸氧化菌(NO₂)完成^[3],其中第一步反应是硝化过程限速步骤,所以目前对硝化细菌的研究大多针对氨氧化菌。由于使用常规的微生物培养方法研究硝化细菌时遇到了困难^[4],并且传统培养方法无法避免培养分离菌株与环境中实际存在菌株的差异^[5],所以近期使用分子生物学手段研究硝化细菌,例如变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术^[6~8]。本实验选用了我国 3 种土壤,研究不同土壤硝化活性、硝化细菌数量和氨氧化细菌种群,以阐述不同土壤硝化活性与硝化微生物之间的内在联系。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

取表层土壤面(0~20 cm),土壤基本理化和生物性状见表 1。红壤(Red earth)采自江西鹰潭,潮土(Fluvo-aquic soil)采自江苏宿迁,黄泥土(Permeable paddy soil)采自江苏无锡。

表 1 供试土壤理化和微生物性状

Table 1 Selected chemical and microbiological properties of the soils tested								
供试土壤 Soil	pH	有机质 O. M. (g/kg)	全氮 Total N (g/kg)	NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	细菌 Bacteria (10 ⁷ /g soil)	真菌 Fungi (10 ³ /g soil)	放线菌 Atinomyce (10 ⁵ /g soil)
潮土 Fluvo-aquic soil	8.2	9.8	0.73	30	17	3.0	0.7	1.3
黄泥土 Permeable-paddy soil	7.0	12.6	0.58	20	3.0	60.3	2.3	12.0
红壤 Red earth	5.8	8.3	0.39	12	8.0	1.0	21.0	5.0

1.2 土壤硝化能力测定

将 154 mg of N/kg dry soil (280 kg of N/hm²)用量的(NH₄)₂SO₄ 加入装有 33g 新鲜土壤(过筛<4mm)的广口瓶中,加入水达到 60% WFPS(water-filled pore space), 28 C 黑暗培养 28d。广口瓶盖子扎孔后盖上,培养前称重。培养的 28d 中,每 3d 称重,补充损失的水分,使水分保持 60%WFPS。每周测定 NH₄⁺、NO₂⁻ 和 NO₃⁻ 浓度,以土壤中 NO₃⁻ 和 NO₂⁻ 浓度之和占 NH₄⁺、

NO_2^- 和 NO_3^- 浓度之和的百分数表示土壤硝化势^[9]。

1.3 土壤 DNA 提取

采用改进的 Yeates 等人^[10]的酶裂解法提取土壤中的 DNA。取 5g 新鲜土壤加入离心管中,加入 10ml 含蛋白酶 K(proteinase K)的抽提缓冲液。37℃,180 r/min,培养 1h 后加入 SDS60℃再培养 1h。离心收集上清,沉淀用抽提液重复上述步骤进一步抽提,离心,收集上清与前次上清混合。上清使用饱和酚/氯仿/异丙醇混合液处理后,加乙醇静置,离心,轻轻倒去上清,于室内自然风干,最后溶解于 0.5ml TE。

1.4 土壤硝化细菌计数

AOB 使用 MPN-Griess 法计数^[9],NOB 使用 MPN-diphylamine 法^[9]和 MPN-PCR 法计数^[11]。样品以 1:10 比例进行梯度稀释,3 个重复,最后从 Cochran 表查出硝化细菌的数量。土壤中提取的 DNA 和 PCR 扩增后的 DNA 分别使用 0.8%和 2%琼脂糖(wt/vol)电泳,TBE 缓冲液。EB 染色后在成像系统(BIO-RAD, Bio-Rad Laboratories, America)下观察。

1.5 多聚酶链式反应(PCR)

土壤中提取到的 DNA 使用氨氧化菌特异的 amoA 引物对 amoA-1F and amoA-2R^[8]进行 PCR,amoA-1F 5'端加 GC 夹子^[12](CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G)。反应体系为:0.5 μmol/L 引物,1 U Taq DNA polymerase,PCR 缓冲液,400 μmol/L dNTP,模板 DNA (1 μl),终体积 50 μl。反应的步骤:94℃,2.5min;30 循环 94℃30s,55℃30s,72℃90s;72℃,5min。

1.6 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析及片段断序列测定

PCR 产物通过聚丙烯酰胺凝胶,45% (6% [wt/vol] acrylamide -bisacrylamide [37.5:1]; 18% deionized formamide, 3.1 mol/L urea) 到 65% (6% [wt/vol] acrylamidebisacrylamide [37.5:1]; 26% deionized formamide, 4.5 mol/L urea)浓度梯度。胶在 DGENETM 系统(Bio-Rad)中进行电泳,0.5×Tris-acetate-EDTA 缓冲液,60℃,100 V,电泳 17 h。EB 染色后,在成像系统(BIO-RAD, Bio-Rad Laboratories, America)下观察结果。

从 DGGE 胶上切下电泳条带,震荡溶解到灭菌的去离子水中,再次 PCR 扩增。PCR 产物溶于大约 20 μl 灭菌的去离子水中。纯化的条带用于由上海博雅生物技术公司予以测序。与已经报道的部分 amoA 基因序列^[13~15]进行比较,系统分类及分子进化分析使用 MEGA version 2.0 软件绘制系统树。

1.7 土壤氨氧化菌硝化能力

使用无机液体培养基(LM)对土壤氨氧化菌进行分离纯化培养。取 10g 土壤(潮土,黄泥土,红壤)加入装有 100ml 灭菌培养基的 250ml 三角瓶中。180r/min,26℃,黑暗培养 14d 后,将 10ml 培养液转接到 100ml 含 5mmol/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的磷酸缓冲液(pH 5.8, 7.0, 8.0),同上条件培养 14d 后,测定 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 浓度。由于该方法纯化出来的氨氧化菌一直伴随有亚硝酸氧化菌,产生的亚硝酸盐立即氧化为硝酸盐。所以以土壤中 NO_3^- 和 NO_2^- 浓度之和占 NH_4^+ 、 NO_2^- 和 NO_3^- 浓度之和的百分数表示不同土壤分离出的氨氧化细菌硝化能力。

1.8 土壤 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 的测定

用 2 mol/L KCl 以 1:4 (wt/vol)比例浸提土壤,用 Bran+LUEBBE 流动分析仪(Bran+LUEBBE, America)测定浸提液的 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 浓度^[16]。所有数据测定 3 次作为测定平均值。

1.9 数据分析

数据采用 SPSS 数据分析软件(SPSS, 1999)。

2 结果与分析

2.1 不同土壤的硝化能力

在 28d 培养结束时,潮土表现出最强的硝化能力,几乎 100%的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 转化为 NO_3^- -N,其中在培养 7d 后就有 60%的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 转化为 NO_3^- -N,而红壤的硝化能力最弱,只有 4.9%的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 转化为 NO_3^- -N,黄泥土的硝化能力介于两者之间,且在培养 14d 后随时间硝化能力上升迅速,到培养结束时已有 75%的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 转化为 NO_3^- -N(图 1)。

2.2 不同土壤硝化细菌计数

不同土壤中的氨氧化菌和亚硝酸氧化菌数量见表 2。采用 MPN-Griess 法计算 3 种土壤中氨氧化菌数量,3 种土壤氨氧化菌数量处于不同的数量级,差异显著。其中黄泥土中氨氧化菌最

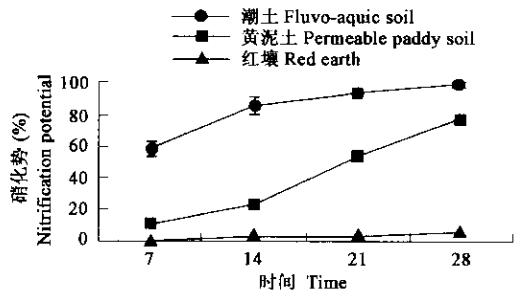


图 1 不同土壤硝化势动态变化

Fig. 1 Changes in nitrification potential of different soils with incubation time

多,达到 $10^7/\text{g dry soil}$;潮土其次, $10^5/\text{g dry soil}$;红壤最小, $10^4/\text{g dry soil}$ 。采用 MPN-PCR 法计算土壤中亚硝酸氧化菌,3 种土壤亚硝酸氧化菌数量没有差异。

2.3 不同土壤中氨氧化菌区系

图 2 为 3 种土壤中 DNA 进行 AOB 特异的 *amoA* 基因扩增后的 DGGE 图谱,每种土壤都作了两次重复。3 种土壤的 *amoA* 扩增序列的 DGGE 图谱有 11 条条带,并且 3 种土壤都含有 4 条以上条带,潮土有条带 3、6、7、8 和 9;黄泥土有条带 2、3、9 和 11;红壤有条带 1、4、5、10。由于每种土壤都作了两次重复,对条带进行分析时只选在两次重复的 DGGE 图谱中都出现的条带进行研究。潮土和黄泥土的 DGGE 图谱具有条带 3 和条带 9 两条相同条带,而红壤的 DGGE 图谱与这两种土壤的 DGGE 图谱没有共同条带。为了更好地了解这 11 条条带之间的相互关系,需要对这些条带进行序列分析。

将这 11 条条带序列与 genbank 中的氨氧化菌 *amoA* 基因序列一起使用 MEGA 软件进行系统树分析(图 3)。所有 11 条条带之间的相似性都小于 99%(遗传距离大于 0.01),因此没有条带的核苷酸序列是完全相同的。条带 3、4、5、6、7、8、11 间的相似性超过 90%(遗传距离小于 0.1)。其余的条带(1、2、9、10)间的相似性都低于 90%(遗传距离大于 0.1)。条带 9 和条带 10 间的相似性低于 65%,条带 9、10 与其余条带间的相似性低于 60%。

所有的 11 条条带与 *Nitrosospira* 属的 cluster 1 和 cluster3 的序列具有高度相似性。

对红壤图谱进行分析,发现,红壤图谱与潮土和黄泥土的图谱没有共同条带。红壤图谱中的条带 1 和条带 10 与其余条带间的相似性低于 90%,尤其是条带 10 与其余条带的相似性低于 65%,条带 1、10 是红壤特有的条带。红壤图谱条带 10 与 *Nitrosospira* 属的 cluster3bz97838 亲源性比较近,条带 1 与 *Nitrosospira* 属的 cluster3aAF353263 亲源性比较近。

对潮土图谱进行分析,发现,潮土图谱与黄泥土图谱有共同条带 3、9。潮土和黄泥土图谱共有的条带 9 与其余条带的相似性低于 65%,是潮土和黄泥土特有的条带,与 *Nitrosospira* 属的 cluster 3b Z97849 亲源性可能比较近。

对黄泥土图谱进行分析,发现,除了与潮土图谱共有的条带 9 外,黄泥土图谱中的条带 2 与其余条带的相似性低于 90%,为黄泥土特有的条带,与 *Nitrosospira* 属的 cluster 3a AF353263 亲源性很近。

根据变性梯度凝胶电泳(DGGE)对不同 DNA 片断分离原理,可知 3 种土壤样品的 PCR 产物中含有数目不等的不同的 DNA 片断,它们就是氨氧化菌的 DNA 片断。

从上述结果可知,红壤有 4 个氨氧化菌种属,红壤与潮土和黄泥土没有共同的氨氧化菌种属。红壤有与潮土和黄泥土的氨氧化菌种属亲源性较远,特有的两个氨氧化菌种属,这两个种属与已知的 *Nitrosospira* 属的 cluster3bz97838 和 *Nitrosospira* 属的 cluster3aAF353263 亲源性比较近。但是红壤与潮土和黄泥土也有相似性大于 90%的两条条带,因此红壤也有与潮土和黄泥土亲源性很近的两个氨氧化菌种属。

潮土有 5 个氨氧化菌种属,潮土与黄泥土有共同的两个氨氧化菌种属。这两个种属其中一个种属是潮土和黄泥土特有的,与红壤的氨氧化菌种属亲源性较远的氨氧化菌种属,这个种属与已知的 *Nitrosospira* 属的 cluster 3b Z97849 亲源性可能比较近。潮土的另外 4 个种属与红壤和黄泥土种属亲源性都比较近。

表 2 不同土壤中硝化细菌的数量		
Table 2 Counts of nitrifying bacteria in different soils		
土壤 Soil	AOB ^a (No. /g soil)	NOB ^b (No. /gsoil)
潮土 Fluvo-aquic soil	2.5×10^5	2.5×10^4
黄泥土 Permeable paddy Soil	4.5×10^7	2.5×10^4
红壤 Red earth	9.5×10^4	2.5×10^4

^a AOB 数量由 MPN-格式法测定 Numbers of AOBs per gram of dry soil were obtained by MPN-Griess method;^b NOB 数量由 MPN-PCR 法测定 Numbers of NOBs per gram of dry soil were obtained by MPN-PCR method

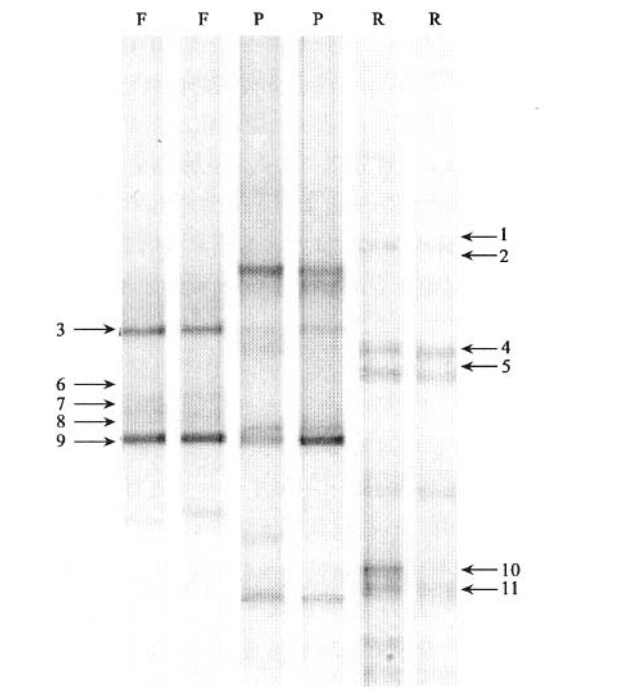


图 2 不同土壤 *amoA* 基因 PCR 产物 DGGE 分析结果
Fig. 2 DGGE analysis of *amoA* fragments retrieved from different soils

图中标注数字条带用于序列测定 The number of the bands correspond to the following sequences analyze (Fig 3 on right); F: 潮土;P:黄泥土;R:红壤 F: Fluvo-aquic soil, P: Permeable paddy soil, R: Red earth

黄泥土有 4 个氨氧化菌种属,黄泥土除了与潮土共有的一个种属是两种土壤特有的氨氧化菌种属外,黄泥土还有一个种属是黄泥土特有的,与 *Nitrosospira* 属的 cluster 3a AF353263 亲源性很近。黄泥土的另两个种属与红壤和潮土种属的亲源性都比较近。

2.4 不同土壤中氨氧化菌的硝化能力

3 种土壤中分离到的氨氧化菌在相同 pH(5.8,7.0,8.0)条件下硝化势差异不显著(图 4),但是从黄泥土(pH7.0)分离到的氨氧化菌在 pH7.0 缓冲液中硝化势为 31.50%,从潮土(pH8.0)分离到的氨氧化菌在 pH8.0 缓冲液中硝化势为 42.36%,从红壤(pH5.8)分离到的氨氧化菌在 pH5.8 缓冲液中硝化势为 27.82%。可见,3 种土壤硝化细菌在与土壤环境 pH 近似的缓冲液中硝化势差异显著,从红壤中分离到的氨氧化菌硝化势最小,潮土氨氧化菌硝化势最大,黄泥土氨氧化菌介于两者之间。从图 4 还可以看到 3 种土壤分离到的氨氧化菌随着 pH 升高硝化势增加,但是不同土壤氨氧化菌对 pH 表现出不同的反应,潮土(pH8.0)在 pH 低于 7(5.8 和 7.0)的缓冲液中硝化势差异不大,但是在 pH8.0 时硝化势增加极显著;而黄泥土和红壤没有如此明显。

3 讨论与结论

3.1 应用 *amoA* 基因 PCR 和 DGGE 技术研究不同土壤氨氧化菌种群差异

所有自然环境中对紫细菌门 β 和 γ 亚门的氨氧化菌的多样性分析以往都是基于 16S rDNA 序列差异进行的^[17],但是对于氨氧化菌这类细菌来说,仅仅基于 16S rDNA 序列是远远不够的^[18],所以近期的研究开始将 *amoA* 序列分析应用其中^[11,19,20]。*amoA* 基因负责编码氨单加氧酶(ammonia monooxygenase AMO)的 α 亚基,是所有好氧氨氧化菌中的重要酶,催化氨氧化到羟胺的过程^[21],是硝化过程的限速步骤。不同氨氧化菌 *amoA* 基因序列差异比 16S rDNA 序列差异大^[22],因此对于研究氨氧化菌这种在复杂的土壤环境中数量不多的自养细菌,基于 *amoA* 基因序列分析的方法比基于 16S rDNA 序列分析的方法针对性更强,提供的信息也更多,更适合用于分析氨氧化菌这类种间亲缘关系很近的种群研究^[23,24]。从本实验可以看到,将本次实验结果与以往用 16S rDNA 序列分析得出的系统分类结果比较,所有的种群都属于 cluster 1 和 cluster 3,但是 3 种土壤的 DGGE 图谱确实存在明显差异,并且序列分析结果也表明 3 种土壤氨氧化菌种群不同,其中 cluster 3a 和 cluster 3b 差异显著。可见, *amoA* 基因 PCR 与 DGGE 连用,是比 16S rDNA PCR 与 DGGE 连用研究氨氧化菌种群更灵敏的方法。

本实验中的 3 种土壤氨氧化菌与 *Nitrosospira* 属的 cluter 1 和 cluster3 具有高度亲源性,这结果与以往的结论“土壤环境中硝化细菌以 *Nitrosospira* 属为主,而非 *Nitrosomonas* 属”^[4,18]相一致。3 种不同土壤具有相近或相同的氨氧化菌,又都有各自特殊的氨氧化菌。其中红壤中的氨氧化菌种属比潮土和黄泥土氨氧化菌种属差异更大。Kowalchuk 等人^[18,25]和 Stephen 等人^[2,26]研究表明在大多数酸性土壤中, *Nitrosospira* 是最普遍的 AOB 种属,并且酸性环境选择性适合 *Nitrosospira* cluster2。但是 Hastings 等人^[27]研究表明在 *Nitrosomonas* 是酸性森林土壤中主要的 AOB 种属。Bruns 等人^[6]和 Mendum 等人^[28]研究表明 *Nitrosospira* cluster3 是大多数中性好气农田土壤中主要的 AOB 种属,并且当农田土壤停止施肥后 AOB 种属从 *Nitrosospira* cluster3 为主变为以 *Nitrosospira* cluster4 为主。不同的土壤中 AOB 种属不同,主要与土壤环境不同有关,其中土壤 pH 是最重要的影响因素^[18],不同土壤 AOB 种属可能就是不同的土壤环境对 AOB 种属长期选择的结果。

3.2 不同土壤硝化能力及其硝化细菌数量

土壤培养实验结果表明 3 种土壤硝化能力差异显著,尤其是红壤表现出极低的硝化活性,这与以往的报道结果一致^[19],也与自然界中红壤中硝酸盐含量极低的现象相一致。土壤硝化活性与硝化细菌活性有关。从土壤分离到的硝化细菌在不同 pH 缓

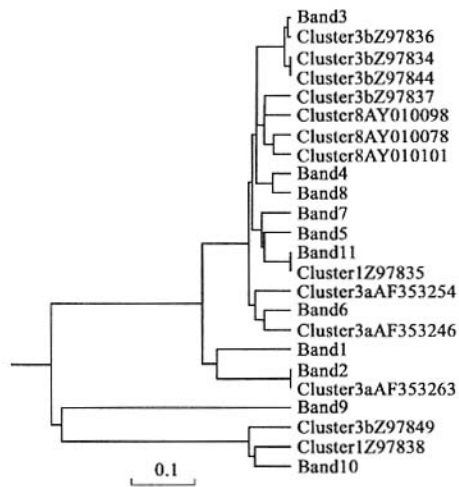


图3 DGGE 图谱的相似性分析(条带号与图 2 对应)

Fig. 3 Similarities between DGGE bands of 3 soils. (The number of the bands correspond to DGGE profiles of Fig. 2)

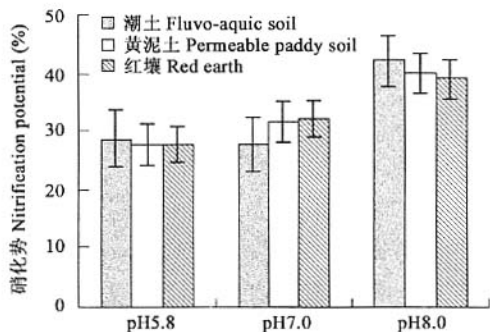


图4 不同 pH 条件下 3 种土壤氨氧化菌硝化势比较

Fig. 4 Nitrification potential of AOB in three soils under different pH condition

冲液中进一步培养发现,在与土壤 pH 条件接近的情况下,潮土硝化细菌硝化能力最高,黄泥土其次,红壤最小。

将土壤氨氧化菌和亚硝酸氧化菌数量与土壤硝化活性进行比较后发现,硝化活性最强的潮土中氨氧化菌数量并不是最多的,而是黄泥土中的氨氧化菌数量最多,而所有土壤中的亚硝酸氧化菌数量没有差异。土壤中的硝化作用活性与土壤中的硝化细菌数量没有显著相关,有人将这种现象作为土壤中异养型硝化作用存在的证明^[18],但是 Kowalchuk 和 Stephen^[18]也提到土壤中硝化细菌种属差别很大,不同种属的硝化细菌可能硝化活性不同,从而可能导致土壤中硝化活性差异。Nannipieri 等人^[29]认为,土壤中微生物的数量并不能代表土壤真正的功能,相同数量的土壤微生物在不同的土壤条件下表现出的活性差异很大。3 种土壤差异显著的理化性状可能影响了硝化细菌活性,因此在对不同土壤硝化细菌进行研究时不仅需要硝化细菌数量进行研究,还有研究不同土壤中硝化细菌的种属及不同环境条件对硝化细菌硝化活性的影响。

3 种土壤中亚硝酸氧化菌数量没有差异。Degrange 等人^[11]也发现硝化势差异很大的土壤亚硝酸氧化菌数量并没有差异。现有的一些研究发现土壤中亚硝酸氧化菌数量通常在 $10^4 \sim 10^6$ 这个数量级上,而且各种不同土壤中亚硝酸氧化菌数量差异不大,不象不同土壤间氨氧化菌数量差别很大。这可能与采用的研究方法有关,通常使用 MPN-二苯胺方法进行检测,本实验初期也采用二苯胺对产生的硝酸根离子进行检测,但是经过 3 周的培养后,所有的试管(最高稀释 10^9)检测都呈蓝色,因为在有些情况下亚硝酸根离子也会与二苯胺反应产生蓝色反应,所以通常还要继续培养至亚硝酸氧化菌将所有的亚硝酸根离子全都消耗后再在测定不存在亚硝酸根的条件下测定硝酸根的存在,才可以确定为阳性反应管。这通常需要 2 个月以上的时间,耗时太长。随着分子生物学方法的引入,现在采用 MPN-PCR 的方法测定亚硝酸氧化菌的数量。这种方法设计的引物都是主要针对 *Nitrobacter*,这种方法认为土壤环境中的亚硝酸氧化菌主要是 *Nitrobacter*,其他种属即使存在也可以用这种引物进行检测。现在发现,在一些环境中存在着其他种属的亚硝酸氧化菌,而设计的这种引物对不同种属的亚硝酸氧化菌的检出率到底怎样,还没有得到验证。MPN-PCR 的方法无疑克服了培养过程产生的很多困难,是测定亚硝酸氧化菌的一种可行方法。

References:

- [1] Troelstra S R, Wagenaar R, DeBoer W. Nitrification in Dutch heathland soils I. General soil characteristics and nitrification in undisturbed soil cores. *Plant & Soil*, 1990, **127**: 179~192.
- [2] Stephen J R, McCaig A E, Smith Z, *et al.* Molecular diversity of soil and marine 16S r DNA sequences related to β -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 4147~4154.
- [3] Abbassi M K, Adams W A. Loss of nitrogen in compacted grassland soil by simultaneous nitrification and denitrification. *Plant & Soil*, 1998, **200**: 265~277.
- [4] Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, *et al.* Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominate populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**: 3042~3051.
- [5] Klotz M G, Alzerreca J, Norton J M. A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia oxidizing bacteria: A third member of the *amo* operon. *FEMS Microbiology Letter*, 1997, **150**: 65~73.
- [6] Bruns M A, Stephen J R, Kowalchuk GA, *et al.* Comparative of ammonia oxidizer 16S r RNA gene sequences in native, tilled and successional soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**: 2994~3000.
- [7] Head I M, Hiorns W D, Embley T M, *et al.* The phylogeny of autotrophic ammonium-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J. Gen. Microbiol.*, 1993, **139**: 1147~1153.
- [8] Rothauwe J H, Witzel K P, Lieack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**: 4704~4712.
- [9] Lu R K ed. *Methods of Soil Analysis*. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2000. 130~132, 256~260.
- [10] Yeates C, Gillings M R, Davison A D, *et al.* Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online*, 1998, **1** (1): 40~47.
- [11] Degrange V, Coûteaux M M, Anderson J M, *et al.* Nitrification and occurrence of *Nitrobacter* by MPN-PCR in low and high nitrifying coniferous forest soils. *Plant and Soil*, 1998, **198**: 201~208.
- [12] Muyzer G, DeWaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S r RNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**: 695~700.
- [13] Norton J M, Low J M, Martin G. The gene encoding ammonia monooxygenase subunit A exists in three nearly identical copies in *Nitrospira* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, **139**: 181~188.
- [14] Kowalchuk G A, Naoumenko Z S, Derikx P J L, *et al.* Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the class Proteobacteria in compost and composting materials. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**: 396~405.

- [15] Ivanova I A, Stephen J R, Chang Y J, *et al.* A survey of 16S r RNA and amoA genes related to autotrophic ammonia-oxidizing bacteria of the β -subdivision of the class Proteobacteria in contaminated ground-water. *Can. J. Microbiol.*, 2000, **46**:1012~1020.
- [16] Bengtsson G, Bergwall C. Fate of ^{15}N labelled nitrate and ammonium in a fertilized forest soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, **32**: 545~557.
- [17] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 340~346.
- [18] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001, **55**: 485~529.
- [19] Ding H, Wang Y S, Xiang H Y, *et al.* Nitrification and denitrification potential in different types of Paddy soils in Fujian Province. *Journal of Agro-Environment Science*, 2003, **22**(6): 715~719.
- [20] Ward B B, Martino D P, Diaz M C, *et al.* Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline Mono Lake, on the basis of 16S r RNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**: 2873~2878.
- [21] Rotthauwe J H, Deboer W, Liesack W. Comparative analysis of gene sequences encoding ammonia monooxygenase of *Nitrosospira* sp. AHB1 and *Nitrosolobus multiformis* C-71. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, **133**: 131~135.
- [22] Purkhold U, Pommerening-Roser A, Juretschko S, *et al.* Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S r RNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**: 5368~5382.
- [23] Luo H F, Qi H Y, Xue K, *et al.* Influence of application of GC-clamp on study of soil microbial diversity by PCR-DGGE. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, **23**(10): 2170~2175.
- [24] Ma Y X, Holmström C, Webb J, *et al.* Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, **23**(8): 1561~1569.
- [25] Kowalchuk G A, Stephen J R, DeBoer W, *et al.* Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. *Environ. Microbiol.*, 1997, **63**:1489~1497.
- [26] Stephen J R, Kowalchuk G A, Bruns M A V, *et al.* Analysis of β -subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**:2958~2965.
- [27] Hastings R C, Butler C, Singleton I, *et al.* Analysis of ammonia-oxidizing bacteria populations in acid forest soil during conditions of moisture limitation. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, **30**:14~18.
- [28] Mendum T A, Sockett R E, Hirsch P R. Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia-oxidizing populations of the β -subdivision of the class Proteobacteria in arable soils to nitrogen fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**:4155~4162.
- [29] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherine M T, *et al.* Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 2003, **54**:655~670.

参考文献:

- [9] 鲁如坤主编. 土壤农业化学分析方法. 北京:中国农业出版社, 2000. 130~132, 256~260.
- [19] 丁洪,王跃思,项虹艳,等. 福建省几种主要红壤性水稻土硝化与反硝化活性. 农业环境科学学报, 2003, **22**(6):715~719.
- [23] 罗海峰,齐鸿雁,薛凯,等. 在 PCR-DGGE 研究土壤微生物多样性中应用 GC 发卡结构的效应. 生态学报, 2003, **23**(10): 2170~2175.
- [24] 马悦欣, Holmström C, Webb J, 等. 变性梯度凝胶电泳(DGGE)在微生物生态学中的应用. 生态学报, 2003, **23**(8): 1561~1569.