

DOI: 10.5846/stxb201504140752

卢圣鄂,王莹燕,陈勇,涂仕华,张小平,辜运富.不同施肥制度对石灰性紫色水稻土中氨氧化古菌群落结构的影响.生态学报,2016,36(21):

Lu S E, Wang Y Y, Chen Y, Tu S H, Zhang X P, Gu Y F. Impact of different long-term fertilization systems on ammonia oxidation Archaea community structures in Calcareous Purple Paddy soil. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(21):

不同施肥制度对石灰性紫色水稻土中氨氧化古菌群落结构的影响

卢圣鄂¹, 王莹燕¹, 陈勇¹, 涂仕华², 张小平¹, 辜运富^{1,*}

¹ 四川农业大学资源学院微生物系, 成都 611130

² 四川省农业科学院土壤肥料研究所, 成都 610066

摘要: 研究不同施肥制度对水稻土氨氧化古菌(ammonia oxidation archaea, AOA)群落结构和垂直分布特征的影响,可以深入认识不同施肥制度下的石灰性紫色水稻土氮素循环特征及微生物驱动机制,为该地区科学施肥、培肥地力提供理论依据。利用化学分析和变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)对不同施肥制度下石灰性紫色水稻土理化性质和 AOA 群落结构进行了分析。结果显示:相对于无肥处理,施肥会降低石灰性紫色水稻土 pH 和硝氮含量,而增加土壤有机质、全氮和氨氮含量。伴随土壤深度增加,土壤 pH 增加,全氮和硝氮含量降低,氨氮含量变化趋势不明显。不同施肥制度在不同土壤深度对石灰性紫色水稻土 AOA 群落结构产生不同的胁迫效应,不同施肥制度下的 AOA 群落结构在 0—20 cm 处差异不明显;土壤深度增加,不同施肥制度下的 AOA 群落结构表现出明显差异,CK 和 N 肥处理下的 AOA 群落结构较简单。AOA 群落结构多样性指数和丰富度随土壤深度增加而减小。石灰性紫色水稻土 AOA 与来自不同土壤和水体环境的 AOA 具有明显相似性。冗余梯度分析(Redundancy gradient analysis, RDA)显示 pH($P=0.012$)是造成石灰性紫色水稻土 AOA 群落结构差异的主要原因。研究揭示石灰性紫色水稻土中的 AOA 群落结构受施肥制度明显影响并表现出明显的垂直分布特征。

关键词: 长期定位施肥;石灰性紫色水稻土;DGGE;AOA 群落结构

Impact of different long-term fertilization systems on ammonia oxidation Archaea community structures in Calcareous Purple Paddy soil

LU Sheng'e¹, WANG Yingyan¹, CHEN Yong¹, TU Shihua², ZHANG Xiaoping¹, GU Yunfu^{1,*}

¹ Department of Microbiology, College of Resource, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

² Soil and Fertilizer Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China

Abstract: Increasing evidence revealed that ammonia oxidation Archaea (AOA) belonging to *Thaumarchaeota* could control nitrification in various agricultural ecosystems. Studying the impact of different long-term fertilization systems on the shift of the AOA community structure and vertical distribution would contribute to understanding the soil nutrient biogeochemical cycles and microbial drive mechanisms. In the present study, an “N, P, K long-term fertilization field experiment (1982—2014)” was established in a Calcareous Purple Paddy soil in Suining City, Sichuan Province of the PR China. Eight treatments including three chemical fertilizer (CF) treatments (N, NP, and NPK), three CF plus farmyard manure (M) treatments (NM, NPM, and NPKM), M only, and no fertilizer (CK) as control were used. Soil samples amended with different long-term fertilization systems at four different depths (0—20, 20—40, 40—60, and 60—90 cm) were

基金项目: 国家自然科学基金(41201256);四川省自然科学基金(SC200902158);四川农业大学“双支计划”(01470702)

收稿日期: 2015-00-00; **网络出版日期:** 2015-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: guyf@sicau.edu.cn

collected; the soil physico-chemical parameters and the shift of the AOA community structure and vertical distribution were analyzed by chemical analysis and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The results showed that compared to the no fertilizer treatment (CK), soil pH decreased under the CF treatments, and showed little variation under CFM treatments. The pH values in the 0—20 cm soil depth were lower than those in other soil depths. The combined use of farmyard manure and chemical fertilizer could also improve the soil total nitrogen concentration. The total nitrogen content in 0—20 cm soil depth was also higher than that of other depths. Fertilizer increased the soil ammonia content in the 0—20 cm soil depth, and in this soil depth, the CK treatment had the lowest ammonia concentration. Furthermore, soil ammonia concentrations under the four CFM fertilizer treatments (e.g. M, NM, NPM, and NPKM) were similar. Additionally, chemical fertilizer plus farmyard manure decreased the soil nitrate concentration, and the nitrate concentration in the 0—20 cm soil depth was higher than that of other depths. Based on the DGGE analysis, different fertilization systems affected the AOA community structure in different soil depths differently. The AOA community structure in the 0—20 cm depth with different fertilizer amendments showed minor variation. With increasing soil depth, the AOA community structure with different fertilization systems varied significantly. The AOA community structure in the CK and N fertilized soil were much simpler than those under CF and CFM fertilizer treatments. However, the AOA community structure showed significant vertical variation, both the richness and Shannon-Wiener diversity index in the 0—20 cm soil depth were the highest, while those in the 60—90 cm soil depth were the lowest. According to the sequence and phylogeny analysis, AOA in Calcareous Purple Paddy soil were all affiliated to *Thaumarchaeota*, and they were highly similar to the AOA in different soil and water environments. According to the redundancy gradient analysis (RDA), four soil physico-chemical parameters such as pH, total nitrogen, ammonia, and nitrate concentration showed 11.3, 2.8, 1.8, and 1% contributions to the AOA community structure, respectively. Soil pH ($P = 0.012$) was the critical factor to shape the AOA community structure in Calcareous Purple Paddy soil. The study revealed that AOA in the Calcareous Purple Paddy soil responded to the fertilization systems variously, and showed an obvious vertical distribution.

Key Words: Long-term fertilization; Calcareous purple paddy soil; DGGE, AOA community structure

自然界的氮循环主要包括硝化作用、固氮作用、反硝化作用和氨氧化作用 4 个过程,均由微生物驱动,而硝化作用(nitrification)是地球氮素循环(biogeochemical cycle)中心环节,其中氨氧化($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$)是硝化作用的限速步骤,决定着硝化过程的速率^[1]。传统观点认为变形菌纲的氨氧化细菌(ammonia oxidizing bacteria, AOB)是地球氮素循环过程硝化作用的主要承担者^[2],但新近研究发现氨氧化古菌(ammonia oxidizing archaea, AOA)广泛分布于海洋、土壤、温泉和湿地^[3]等生态系统中,在全球氮素循环过程中起着重要的作用。AOA 通过氨单加氧酶(AMO)控制氨氧化成亚硝酸盐的速率,*amoA* 是编码氨单加氧酶活性位点多肽的基因,由于 *amoA* 基因自身较强保守性,被作为分子标记广泛应用于氨氧化微生物分子生态学研究^[4]。

AOA 是农田生态系统硝化过程的主要驱动者且受到农业管理措施的明显胁迫,施肥制度、土壤 pH 和土壤类型是影响 AOA 群落结构的重要因子^[5-7]。长期定位施肥会对土壤中的硝化作用和氨氧化微生物的种群结构及丰度等形成明显影响^[8-9]。土壤 pH 因直接影响土壤中氨态氮的有效性而影响氨氧化微生物的种群结构、数量和丰度等特征^[6]。研究表明,在中性和碱性土壤上施用高量氮肥会显著改变 AOB 的群落组成和丰度,而对 AOA 的影响有限^[10-12]。但在酸性土壤上的研究结论却与之相反,长期施肥会显著影响 AOA 群落结构特征^[13-15]。综上,土壤类型不一样,不同施肥制度对土壤氨氧化微生物的影响也不尽一致,受施肥制度影响下的土壤 AOA 的垂直分布变化特征也尚不清楚。

石灰性紫色水稻土是四川乃至全国广泛分布的一种重要农业土壤,面积约 $4.00 \times 10^6 \text{ hm}^2$ ^[16]。该类土壤土质较疏松,有机质含量较低,氮、磷低,土体浅薄,保水抗旱能力差。为保护石灰性紫色水稻土质量,规范施肥管理措施,四川省于 20 世纪 80 年代在该类土壤上建立了“NPK 长期肥效试验”。本文探索了石灰性紫色水

稻土 AOA 群落结构对不同施肥制度的响应特征和垂直分布变化,以期为认识不同施肥制度下石灰性紫色水稻土的氮素循环特征及微生物驱动机制,保护石灰性紫色水稻土质量提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计

长期定位实验点位于四川遂宁市船山区联盟乡二村五组(30°10'50''N,105°03'26''E),气候为亚热带季风气候,全年气候温和,雨量充沛。土壤为原生钙质紫色土属,遂宁组母质,二泥田土种。试验始于 1982 年,完全随机区组设计,共 8 个处理:(1)不施肥(CK);(2)氮肥(N);(3)氮磷肥(NP);(4)氮磷钾肥(NPK);(5)农家肥(M;主成分为猪厩肥,有机质含量 1.5 mg/kg);(6)氮肥+农家肥(NM);(7)氮磷肥+农家肥(NPM);(8)氮磷钾肥+农家肥(NPKM)。肥料施用量:氮肥(N):55.2 kg/ha;钾肥(KCl):31.5 kg/ha;磷肥(P_2O_5):13.2 kg/ha;农家肥: 3×10^4 kg/ha,等氮量设计。实验开始时土壤的养分情况为:pH 8.6,有机质 15.9 g/kg,全氮 0.109%,碱解氮 66.3 mg/kg,全钾 2.689%,有效钾 130.6 mg/kg,缓效钾 699.4 mg/kg,全磷 0.135%,有效磷 3.9 mg/kg。

1.2 土样采集与预处理

于 2013 年 7 月 1 日水稻淹水种植期间,在小区内按“梅花型”布点取样,用土钻分别钻取 0—20 cm(L1),20—40 cm(L2),40—60 cm(L3)和 60—90 cm(L4)深的土样,分层混匀,用无菌 PET 树脂袋封装放于冰盒中带回实验室。取混合均匀的新鲜土样立即提取土壤总 DNA,另取部分土样于室温下风干后进行土壤理化性质测定,剩余土样于-20 °C 保存备用。

1.3 土壤基本理化性质测定

测定方法参照鲁如坤土壤农业化学分析方法^[17]。

1.4 土壤 AOA 群落结构的 PCR-DGGE 分析

1.4.1 土壤微生物总 DNA 提取

采用 Fast DNA Spin Kit for Soil(Qbiogene, Carlsbad, CA, USA)的试剂盒方法,称取 0.5 g 新鲜土壤样品,重复 3 次,按试剂盒上的步骤进行土壤微生物总 DNA 的提取。

1.4.2 *amoA* 基因的 PCR 扩增

PCR 引物 CrenamoA-23f 的序列:5'-ATGGTCTGGCTWAGACG-3',引物 CrenamoA-616r 的序列:5'-GCCATCCATCTGTATGTCCA-3'^[18]。反应体系:PCR Master Mix(TIANGEN BIOTECH. BEIJING)25 μ L,每种引物 0.5 μ L(25 pmol/ μ L,10 ng 土壤总 DNA,加 ddH₂O 至终体积 50 μ L。反应程序:预变性 95 °C 5 min,变性 95 °C 30 s,退火温度 52 °C 30 s,延伸温度 72 °C 45 s,共进行 32 个循环,72 °C 10 min,最后于 4 °C 恒温保存。取 PCR 产物各 2 μ L,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统(Gel Doc Documentation System, Bio-Rad, USA)下观察。

1.4.3 DGGE 分析

取 PCR 产物 15 μ L 进行 DGGE 分析,变性剂梯度为 30%—60%,聚丙烯酰胺凝胶浓度 8%(100%的变性剂为尿素 7 mol 和 40%的去离子甲酰胺)。在 1×TAE 缓冲液中,50 V 30 min 进胶,再在 150 V 60 °C 下电泳 5 h,电泳后用硝酸银^[19]对凝胶进行染色,然后用数码相机拍照。利用凝胶成像系统(Gel Doc Documentation System, Bio-Rad, USA)中自带的 Quantity One 4.4 软件对 DGGE 图谱进行分析。

1.5 DGGE 条带的克隆及测序

PCR 产物用 Clean-Up™试剂盒(MO BIO Labs, Solana Beach, CA, USA)进行纯化,纯化后的 PCR 产物与 pGEM-T Vector 进行连接,利用 *E. coli* DH5 α 感受态细胞进行转化,用氨苄青霉素(100 mg/L)抗性和 PCR 进行检测,采用蓝白斑筛选阳性克隆子,送上海生物工程技术有限公司进行测序。

1.6 数据处理

基础数据的处理利用 Excel 2007 进行,Duncan 单因素方差分析用 SPSS17.0 完成。DGGE 图谱利用 Bio-

Rad 公司的 Quantity One 4.4 分析。用 MEGA 6.0 构建 AOA *amoA* 基因系统发育树。用 Shannon 多样性指数 (H), 丰富度 (S) 和均匀度 (E_H) 等评价 AOA 群落结构多样性。采用 CANOCO4.5.1 软件 (Microcomputer Power, Ithaca, USA) 分析 AOA 群落结构和土壤理化因子间的关系。多样性指数计算公式为: $H = -\sum (n_i/N) \ln (n_i/N)$, $E_H = H/\ln S$, 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 土壤理化性质

不同施肥制度对石灰性紫色水稻土理化性质产生明显影响 (表 1)。相对于无肥处理 ($pH = 7.53$), 农家肥配施无机肥处理下的土壤 pH 介于 7.24—7.41 之间, 显示施肥会降低土壤 pH 。就不同土壤深度而言, 0—20 cm 土壤的 pH 低于其它深度。无机肥处理下的土壤有机质含量介于 1.44%—3.85% 之间, 农家肥与无机肥配施下的土壤有机质介于 1.91%—3.28% 之间, 而 CK 处理下的有机质含量为 1.7%。而农家肥与化肥配施会增加土壤总氮含量。就不同深度而言, 0—20 cm 土壤的总氮含量高于其它深度。农家肥配施化肥会降低土壤硝氮含量, 总体上, 0—20 cm 土壤的硝态氮含量高于其它层次。相对于无肥和化肥处理, 配施农家肥的 4 种施肥处理 (M, NM, NPM, NPKM) 下的氨态氮变化比较平稳。施肥会增加表层土 (0—20 cm) 中的氨态氮含量, 不同深度土壤的氨态氮含量变化趋势不明显。

表 1 不同施肥制度下部分土壤理化性质随采样深度的变化

Table 1 Vertical variation of part of the soil physico-chemical parameters under different fertilization systems

施肥处理 Fertilizer treatments	酸碱度 pH				土壤有机质 SOM				全氮 TN				硝态氮 Nitrate				氨态氮 Ammonium			
	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄
CK	7.03a	7.53ab	7.71a	7.64cd	1.7e	1.31c	0.40f	1.36bc	0.11d	0.10c	0.04c	0.08b	6.70a	2.52cd	2.77a	1.12cd	3.93c	8.71bc	7.12bc	7.61a
N	7.24bc	7.55bc	7.71a	7.66cd	1.44f	0.53e	1.46bc	0.96d	0.14cd	0.03d	0.11b	0.07b	3.80c	4.56a	2.08ab	1.03cd	6.16bd	2.2a	7.59bc	7.96a
NP	7.27b	7.59cd	7.68ab	7.62d	1.71e	0.59e	1.02de	1.95a	0.14cd	0.06cd	0.09b	0.12a	5.49b	3.64b	2.76a	5.03a	9.87a	6.07cd	8.85a	4.62b
NPK	7.41bc	7.51a	7.63b	7.66cd	3.85a	0.25e	1.85a	1.42bc	0.256a	0.02d	0.14a	0.08b	2.43d	2.12de	1.01cd	1.89bc	5.14bc	5.75cd	5.85cd	4.32b
M	7.44c	7.62de	7.71a	7.76a	1.91d	0.85d	0.87e	1.46b	0.16ab	0.08c	0.10b	0.09ab	1.14e	2.68c	2.01bc	2.11b	7.98ab	6.41c	6.51bc	4.51b
NM	7.43c	7.72f	7.72a	7.72ab	2.64c	2.42a	1.65ab	1.52b	0.12bc	0.21a	0.07bc	0.08b	3.45c	2.25de	1.39cd	2.02b	7.79ab	2.74d	5.50cd	7.79a
NPM	7.48c	7.72f	7.71a	7.72a	2.75c	1.95b	1.00e	1.21c	0.18bc	0.15b	0.07bc	0.08b	5.78b	1.41e	0.52d	2.31b	7.37ab	0.0ab	8.26ab	5.76ab
NPKM	7.46c	7.65e	7.73a	7.72bc	3.28b	1.25c	1.26cd	1.44bc	0.18bc	0.08c	0.09b	0.10ab	2.1e	2.39de	2.71bc	0.53d	8.29bc	7.98cd	5.39d	6.75b

SOM: 土壤有机质 Soil organic matter; TN: 全氮 Total nitrogen; CK: 对照; N: 氮肥 Nitrogen; NP: 氮磷肥 Nitrogen and phosphorus; NPK: 氮磷钾肥 Nitrogen; phosphorus and potassium; M: 农家肥 Manure; NM: 氮肥+农家肥 Nitrogen+manure; NPM: 氮磷肥+农家肥 Nitrogen and phosphorus+ manure; NPKM: 氮磷钾肥+农家肥 Nitrogen; phosphorus and potassium+ manure

2.2 不同施肥制度土壤 AOA 的群落结构分析

2.2.1 AOA DGGE 图谱分析

不同施肥处理土壤 AOA 群落结构的 DGGE 图谱见图 1。不同施肥处理土壤 AOA 的 DGGE 图谱在电泳条带数量、强弱和位置均存在一定程度的差异, 显示不同施肥制度影响了石灰性紫色水稻土的 AOA 群落结构。图中共同的条带 (a、b、c 和 d 箭头所示), 说明供试土壤在不同采样深度存在共有的 AOA 类群, 但其亮度不同, 表明长期不同施肥处理 AOA 在 DNA 水平上有改变。不同深度土壤 AOA 种群结构表现出明显差异。在 0—20 cm 处, 不同施肥制度下土壤 AOA 种群结构变化不明显。土壤深度增加, AOA 丰富度减小, AOA 群落结构表现出差异。在 20—40 cm 处, N 处理下 AOA 群落结构最简单, NPK 和 NPKM 肥料处理下的 AOA 群落结构最复杂; 在 40—60 cm 深度, N 处理的 AOA 群落结构最简单, CK 其次, 而氮肥配施农家肥处理下的 AOA 最复杂; 在 60—90 cm 深度, CK 处理下的 AOA 群落结构最简单, NP 处理下的 AOA 群落结构最复杂。

2.2.2 AOA 群落结构多样性分析

不同施肥制度下不同深度土壤 AOA 多样性指数 H 、丰富度 S 、均匀度 E_H 存在显著差异 ($P < 0.05$) (表 2)。在 0—20 cm 处, 不同施肥制度下土壤 AOA 群落结构多样性和丰富度变化不明显。伴随着土壤深度的增加,

AOA 多样性和丰富度减小。在 20—40 cm 处,N 肥处理下 AOA 多样性指数和丰富度最低,NPKM 肥料处理下的 AOA 多样性指数和丰富度最高;40—60 cm 处也是 N 肥处理下土壤 AOA 多样性指数和丰富度最低,CK 其次,NM 肥处理下的 AOA 最高;在 60—90 cm 深度,CK 处理下的 AOA 多样性指数和丰富度最低,NP 处理下的 AOA 最高。

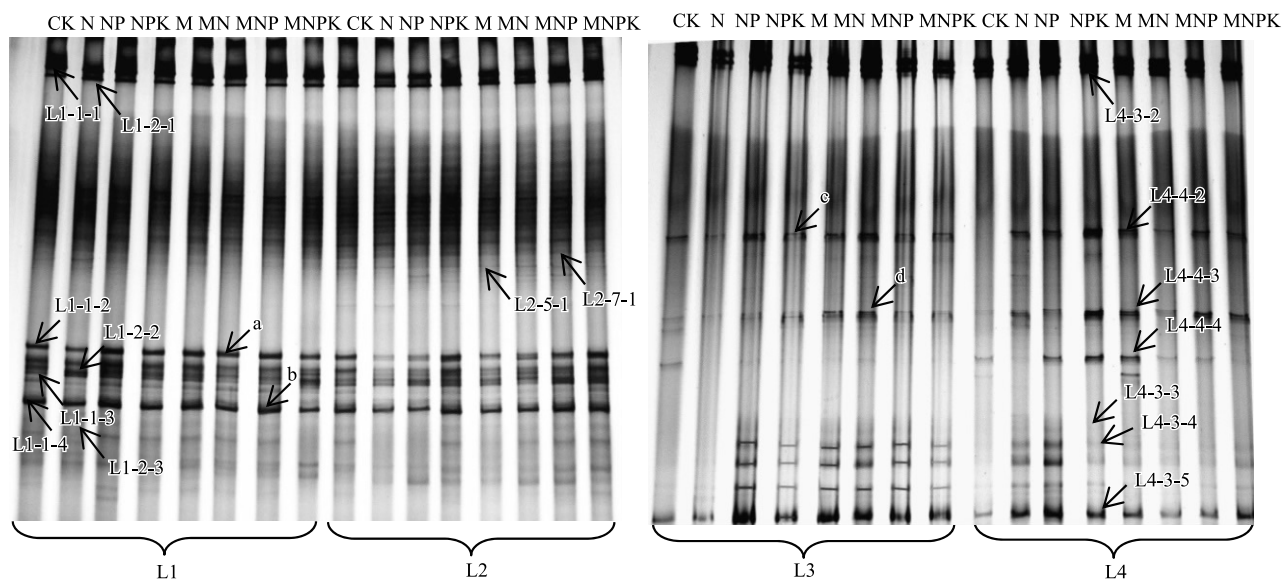


图 1 石灰性紫色水稻土 AOA 的 DGGE 图谱分析

Fig.1 DGGE profile of AOA communities of the Calcareous Purple Paddy soil

L1:0—20cm 深度,L2:20—40 cm 深度,L3:40—60 cm 深度,L4:60—90 cm 深度;施肥处理从左到右依次为无肥(CK);氮肥(N);氮磷肥(NP);氮磷钾肥(NPK);农家肥(M);氮肥加农家肥(NM);氮磷肥加农家肥(NPM);氮磷钾肥加农家肥(NPKM);字母 a、b、c、d 表示各处理间的共同条带;其中 L1-1-2 等编号表示切胶回收条带

表 2 不同施肥处理 AOA 的 Shannon 多样性指数(H),均匀度(E_H)和丰富度(S)

Table 2 Different fertilization AOA Shannon diversity index (H), evenness (E_H) and richness (S)

施肥处理 Fertilizer treatments	Shannon 多样性指数 Shannon's diversity index (H)				均匀度 Evenness (E_H)				丰富度 Richness (S)			
	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄
CK	2.38c	2.40c	1.88e	1.78e	0.992a	0.937d	0.967cd	0.916f	12c	11c	7c	6d
N	2.54ab	2.23b	1.68f	2.25ab	0.991ab	0.870e	0.949c	0.939d	13bc	10d	7c	7c
NP	2.61a	2.46c	2.25c	2.47a	0.991ab	0.988b	0.984a	0.978a	15a	13a	10bc	11a
NPK	2.46b	2.58a	2.16d	2.17cd	0.988b	0.979bc	0.956d	0.942cd	14b	13a	10bc	9b
M	2.46b	2.40c	2.40b	2.21a	0.991ab	1.004b	0.955e	0.921e	14b	12b	11b	10ab
NM	2.46b	2.40c	2.43a	2.06d	0.986b	0.866f	0.975bc	0.939d	15a	12b	11b	9b
NPM	2.36d	2.49bc	2.35c	2.18c	0.988b	0.946c	0.976b	0.945c	14b	12b	12a	10ab
NPKM	2.36d	2.54b	2.37bc	2.24b	0.985c	1.024a	0.973c	0.966b	13bc	13a	11b	10ab

数字后具相同字母表示差异不显著,数字后具不同字母表示差异显著(Duncan 新复极差法测验 $P=0.05$)

2.2.3 AOA 系统发育分析

对石灰性紫色水稻土中优势 AOA 序列和 GenBank 数据库中的相关序列比对后利用 MEGA 6.0 进行系统发育分析(图 2),结果将 16 条序列主要分成 2 个群。第一个群与来源于底泥和土壤中的氨氧化古细菌 amoA 基因相似,分为 3 个簇;第二个群与底泥和水体样品相关,分为一个簇,并与已知氨氧化古菌 *Candidatus Nitrososphaera gargensis*(GI:EU281321)聚在一起。与该类土中 AOA 亲缘关系最近的已知基因序列既有来自土壤的,又有来自沉积物和水体的。在 16 条 DGGE 图谱切胶回收条带中,KP400767,KP400765 与长江河口沉积物古菌序列 KC735504 聚在一起;KP400756,KP400753 和崇明东部潮滩沉积物古菌序列 JQ345856 聚在

一起;KP400760, KP400766 与淹水稻田土古菌序列 KJ908047 聚在一起;KP400768, KP400757 与高原湖泊沉积物古菌序列 KJ005035 聚在一起;KP400764, KP400761 与淹水稻田土古菌序列 KJ907957 聚在一起;KP400758, KP400763 分别与高海拔湿地沉积物古菌序列 KJ645381, 水稻土古菌序列 KJ542817 聚在一起;KP400762, KP400755 分别与大运河古菌序列 KF537053、长江河口古菌序列 KC735430 聚在一起;系统发育结果显示石灰性紫色水稻土 AOA 群落结构较复杂。石灰性紫色水稻土中的氨氧化古细菌均属于奇古菌门, 与已知氨氧化古菌 *Candidatus Nitrososphaera gargensis* (GI:EU281321) 相似。

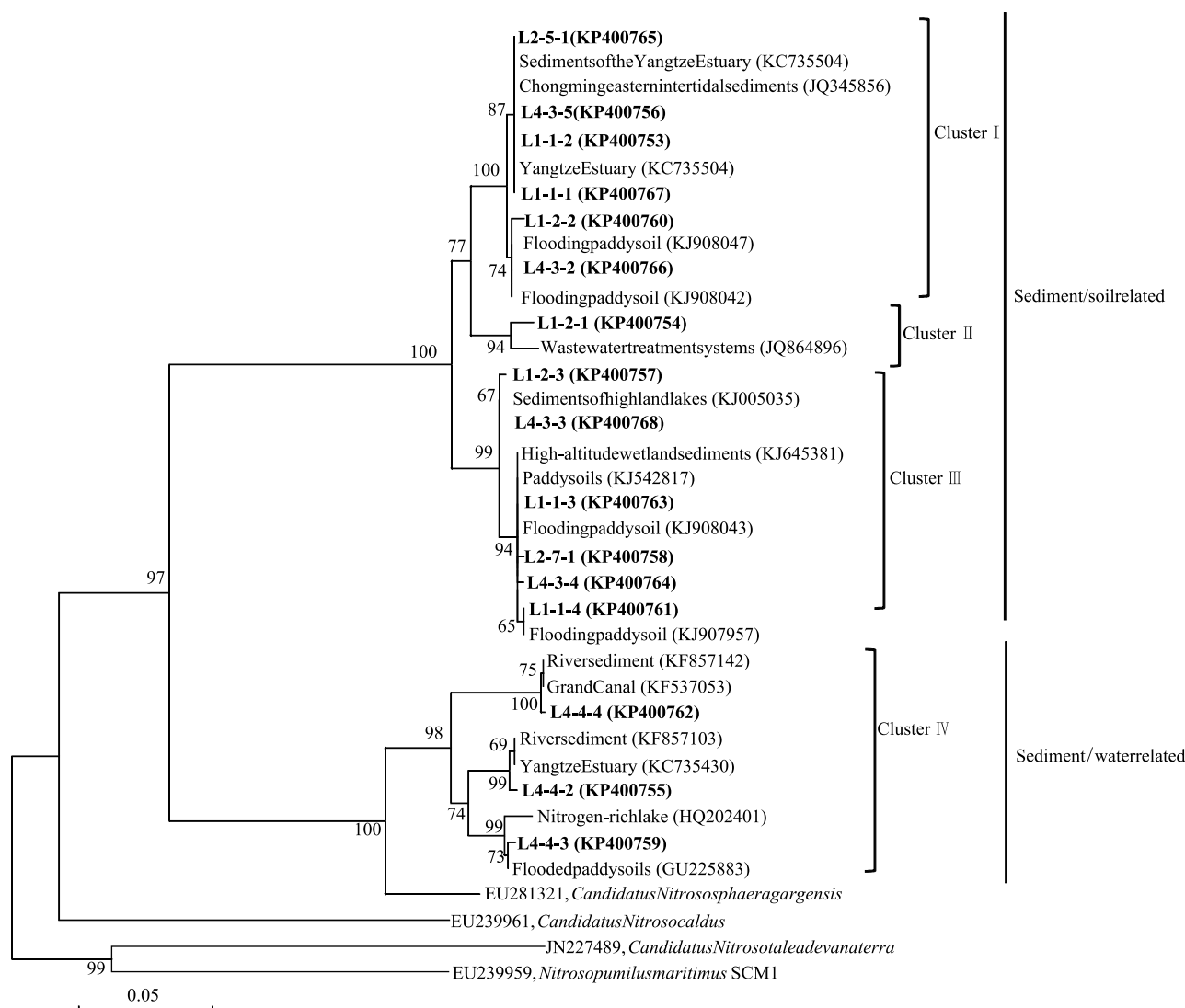


图2 石灰性紫色水稻土中 AOA *amoA* 基因的系统发育树(加粗的编号为本实验所得序列)

Fig.2 Phylogenetic tree of the archaea *amoA* gene sequences retrieved from the Calcareous Purple Paddy soil amended with different fertilization systems, the bold codes refers the sequences obtained in this study

2.3 AOA 群落结构与环境参数的相关性分析

将 DGGE 图谱条带的位置和亮度分别类比于物种的种类和数量^[20], 运用冗余分析(RDA)进行 AOA 群落结构与环境参数间相关性分析(图3)。冗余分析图中箭头表示环境因子, 箭头所处的象限表示环境因子与排序轴间的正负相关性, 箭头连线长度表示该环境因子与样本分布相关程度的大小, 箭头连线间的夹角代表环境因子间的相关程度^[21]。排序轴特征值分别为 0.112、0.035、0.018 和 0.016, 分别解释了 11.2%、3.5%、1.8% 和 1.6% 的 AOA 群落变化, pH 的影响高于其它环境因子。从图中可以看出土壤 pH ($P=0.012$) 是造成影响群落差异的主要因素, 对 AOA 群落结构具有显著影响。AP ($P=0.76$), TN ($P=0.364$), NH_3^+-N ($P=0.402$), SOM

($P=0.49$), $P>0.05$, 对 AOA 群落没有显著影响。

3 讨论

3.1 不同施肥处理对 AOA 群落结构的影响

农业管理措施是影响土壤中各种微生物活动、群落结构等的重要因素,如翻耕、灌溉、施肥等因素都会影响到土壤中各种微生物的多样性^[22]。实验结果表明,在 0—20 cm 处,不同施肥制度下土壤 AOA 群落结构变化不明显。土壤深度增加,AOA 丰富度减小,群落结构出现差异。在 20—40 cm 处,N 肥处理下 AOA 多样性指数和丰富度最低,NPKM 肥料处理下的 AOA 多样性指数和丰富度最高;40—60 cm 深度,寡氮处理下 AOA 多样性指数和丰富度最低,CK 其次,而 NM 处理下的 AOA 最高;在 60—90 cm 深度,CK 处理 AOA 多样性指数和丰富度最低,NP 处理下的最高。Shen 等^[11]研究表明,在中性和碱性土壤上施用高量氮肥会显著改变 AOB 的群落组成和丰富度,而对 AOA 的影响有限。但在酸性土上的研究结论却与之相反,Wu 等^[12]研究证实长期施肥会显著影响 AOA 群落结构特征,且 AOA 比 AOB 在硝化作用中起更重要的作用^[23]。本文通过研究长期定位施肥对石灰性紫色水稻土 AOA 群落结构的影响,显示不同施肥制度下的土壤 AOA 种群结构在 0—20 cm 变化不明显,这与前人的研究结果一致^[11,24]。总体而言,石灰性紫色水稻土表层土壤 AOA 群落结构对不同施肥制度响应不明显;土壤深度增加,不同施肥制度下 AOA 群落结构和丰富度表现出差异。

3.2 不同土壤深度对 AOA 群落结构的影响

土壤是一个复杂的异质体系,土壤奇古菌分布不仅与土壤养分状况紧密相关,也与不同土壤深度理化性质的相互作用有很大的关系^[25-26]。本试验显示石灰性紫色水稻土 L1、L2 深度中的 AOA 群落丰富度 S 高于 L3、L4 深度,其中 L1 深度 AOA 丰富度 S 最高。可能是因为水稻淹水时土壤处于厌氧状态,而水稻根系能够分泌 O_2 ,为水稻根层提供充足的氧,来支持非专一性的好氧反应。另有研究表明,奇古菌门(*Thaumarchaeota*)硝化球菌属的 AOA 更偏好根际的生长环境^[27]。且土壤表层养分更充足,AOA 可用来为自己提供能量的底物更多。向燕等^[28]研究表明太湖沉积物中 AOA 群落结构垂直分布变化不明显。但梁龙等^[29]等的研究却发现 AOA 的数量在百花湖沉积物中存在比较明显的分层现象,其中深层沉积物(22—30 cm)中的 AOA 数量是浅层沉积物(1—21 cm)的 2 倍左右。上述研究反映出,AOA 群落结构在环境样品垂直方向上的变化会受到样品特性的显著影响。而石灰性紫色水稻土中的 AOA 群落结构表现出明显的垂直减少特征,分析原因可能是不同土壤深度的养分状况、通气性等理化性质有较明显差异,会选择性胁迫氨氧化古菌群落的演化,从而导致氨氧化古菌对不同土壤深度产生特异的生态适应^[30-32]。

3.3 土壤环境参数对 AOA 群落的影响

土壤微生物生境的改变往往造成其群落特征发生变化,RDA 则直接将环境变量作为约束条件考虑到排序分析中,从而解释环境因子对微生物群落结构的影响^[33]。本文 RDA 分析显示,排序轴特征值分别为 0.112、0.035、0.018 和 0.016,分别解释了 11.2%、3.5%、1.8%和 1.6%的 AOA 群落变化,pH 的影响高于其他环境因子,显示土壤 pH 是造成影响石灰性紫色水稻土 AOA 群落结构变化的主要因素。而 AP, TN, NH_3^+-N , SOM 对 AOA 群落没有显著影响。与本文结果相似,Zhou 等研究发现紫色土中 AOA 群落结构多样性与 pH 成正相

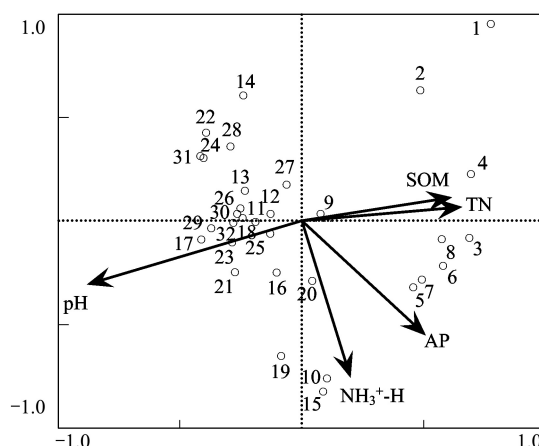


图3 氨氧化古菌群落与环境因子变化的 RDA 排序图

Fig. 3 RDA ordination diagram of ammonia oxidation archaea communities associated with environmental variable

图中数字为土样编号;1—8 采自 L1 深度,对应施肥处理分别为:CK, N, NP, NPK, M, NM, NPM, NPKM;编号 9—16 采自 L2 深度,数字由小到大分别对应 L1 中 1—8 对应的施肥处理;17—24 为 L3 深度,数字由小到大分别对应 L1 中 1—8 对应的施肥处理;25—32 为 L4 深度样品,数字由小到大分别对应 L1 中 1—8 对应的施肥处理

关^[8]。而对南中国地区水稻土氨氧化古菌和氨氧化细菌群落结构的研究中亦发现 pH 是影响 AOA 群落结构变化的关键因子^[6]。

4 结论

本文显示不同深度石灰性紫色水稻土中 AOA 受不同施肥制度影响各不相同,土壤深度增加,施肥对土壤 AOA 群落结构的影响愈加明显。石灰性紫色水稻土中的 AOA 均属于奇古菌门(*Thaumarchaeota*),与已知氨氧化古菌 *Candidatus Nitrososphaera gargensis*(GI:EU281321)相似。pH 是影响石灰性紫色水稻土 AOA 群落结构的重要因子。

参考文献(References):

- [1] Prosser J I. Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 1990, 30: 125-181.
- [2] Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, Schmid M C, Koop H P, Wagner M. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(3): 5368-5382.
- [3] Leininger S, Urlich T, Schlöter M, Schwark L, Qi J, Nicol G W, Prosser J I, Schuster S C, Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442(7104): 806-809.
- [4] 郑有坤, 王宪斌, 辜运富, 张小平. 若尔盖高原湿地土壤氨氧化古菌的多样性. *微生物学报*, 2014, 54(9): 1090-1096.
- [5] Chen X, Zhang L M, Shen J P, Xu Z H, He J Z. Soil type determines the abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in flooded paddy soils. *Journal of Soils and Sediments*, 2010, 10(8): 1510-1516.
- [6] Li H, Weng B S, Huang F Y, Su J Q, Yang X R. pH regulates ammonia-oxidizing bacteria and archaea in paddy soils in Southern China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(14): 6113-6123, doi: 10.1007/s00253-015-6488-2.
- [7] 贾仲君, 翁佳华, 林先贵, Conrad R. 氨氧化古菌的生态学研究进展. *微生物学报*, 2010, 50(4): 431-437.
- [8] Zhou Z F, Shi X J, Zheng Y, Qin Z X, Xie D T, Li Z L, Guo T. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in purple soil under long-term fertilization. *European Journal of Soil Biology*, 2014, 60: 24-33.
- [9] 武传东, 闫倩, 辛亮, 王保莉, 曲东. 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. *农业环境科学学报*, 2012, 31(4): 743-749.
- [10] Chu H Y, Fujii T, Morimoto S, Lin X G, Yagi K, Hu J L, Zhang J B. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(2): 485-491.
- [11] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, Zhang J B, He J Z. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environmental Microbiology*, 2008, 6(10): 1601-1611.
- [12] Wu Y C, Lu L, Wang B Z, Lin X G, Zhu J G, Cai Z C, Yan X Y, Jia Z J. Long-term field fertilization significantly alters community structure of ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea in a paddy soil. *Soil Science Society of America Journal*, 2011, 75(4): 1431-1439.
- [13] He J Z, Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, Zheng Y M, Xu M G, Di H J. 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. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9): 2364-2374.
- [14] Chen X, Zhang L M, Shen J P, Wei W X, He J Z. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in an acid paddy soil. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(3): 323-331.
- [15] Alam M S, Ren G D, Lu L, Zheng Y, Peng X H, Jia Z J. Conversion of upland to paddy field specifically alters the community structure of archaeal ammonia oxidizers in an acid soil. *Biogeosciences*, 2013, 10(8): 5739-5753.
- [16] Zhu B, Wang T, You X, Gao M R. Nutrient release from weathering of purplish rocks in the Sichuan Basin, China. *Pedosphere*, 2008, 18(2): 257-264.
- [17] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [18] Tourna M, Freitag T E, Nicol G W, Prosser J I. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(5): 1357-1364.
- [19] Riesner D D, Steger G, Zimmat R, Owens R A, Wagenhöfer M, Hillen W, Vollbach S, Henco K. Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions. *Electrophoresis*, 1989, 10(5/6): 377-389.

- [20] 杜萍, 刘晶晶, 沈李东, 胡宝兰, 曾江宁, 陈全震, 寿鹿, 廖一波. Biolog 和 PCR-DGGE 技术解析椒江口沉积物微生物多样性. 环境科学学报, 2012, 32(6): 1436-1444.
- [21] 秦华, 李国栋, 叶正钱, 徐秋芳, 曹志洪. 集约种植雷竹林土壤细菌群落结构的演变及其影响因素. 应用生态学报, 2010, 21(10): 2645-2651.
- [22] 李娟, 赵秉强, 李秀英, Hwat B S. 长期有机无机肥料配施对土壤微生物学特性及土壤肥力的影响. 中国农业科学, 2008, 41(1): 144-152.
- [23] Zhang L M, Hu H W, Shen J P, He J Z. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. International Society for Microbial Ecology, 2012, 6(5): 1032-1045.
- [24] 秦子娴. 长期施肥中性紫色水稻土氮素矿化及氨氧化菌的分子生态学研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [25] Fan H X, Fairley D J, Rensing C, Pepper I L, Wang G J. Identification of similar non-thermophilic Crenarchaeota in four Chinese and America pristine soils. Biodiversity Science, 2006, 14(3): 181-187.
- [26] Ke X B, Angel R, Lu Y H, Conrad R. Niche differentiation of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers in rice paddy soil. Environmental Microbiology, 2013, 15(8): 2275-2292.
- [27] Nicol G W, Glover L A, Prosser J I. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. Environmental Microbiology, 2003, 5(3): 152-162.
- [28] 向燕, 吴宇澄, 刘国锋, 刘正文, 吴庆龙. 太湖竺山湾沉积物中氨氧化原核生物的垂直分布与多样性. 生态学报, 2010, 30(6): 1423-1430.
- [29] 梁龙, 梁小兵. 氨氧化细菌和氨氧化古菌在百花湖沉积物中的垂直分布. 矿物岩石地球化学通报, 2014, 33(2): 221-225.
- [30] Briones A M, Okabe S, Umekiya Y, Ramsing N B, Reichardt W, Okuyama H. Influence of different cultivars on populations of ammonia-oxidizing bacteria in the root environment of rice. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(6): 3067-3075.
- [31] Nicolaisen M H, Risgaard-Petersen R, Revsbech N P, Reichardt W, Ramsing N B. Nitrification-denitrification dynamics and community structure of ammonia-oxidizing bacteria in high yield irrigated Philippine rice field. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49(3): 359-369.
- [32] Wang Y N, Ke X B, Wu L Q, Lu Y H. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rice field soil as affected by nitrogen fertilization. Systematic and Applied Microbiology, 2009, 32(1): 27-36.
- [33] 尹锴, 崔胜辉, 赵千钧, 花利忠, 石龙宇, 吝涛. 基于冗余分析的城市森林林下层植物多样性预测. 生态学报, 2009, 29(11): 6085-6094.