三种农田土壤中氨氧化细菌 *amo*A 基因多样性比较分析*

汪　峰[1,2,3,4]　曲浩丽[1]　丁玉芳[1]　孙　波[3]　崔中利[1]　曹　慧[1†]

（1 南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室，南京　210095）
（2 南京农业大学资源与环境科学学院，南京　210095）
（3 中国科学院南京土壤研究所，南京　210008）
（4 中国科学院研究生院，北京　100049）

摘　要　比较分析中国东部不同季风气候区中海伦黑土（HL）、封丘潮土（FQ）和鹰潭红壤（YT）3 种土壤氨氧化细菌 *amo*A 基因多样性。采用非培养方法直接从土壤中提取微生物总 DNA，用氨氧化细菌 *amo*A 基因特异引物扩增总 DNA，构建了 3 种土壤 *amo*A 基因文库，并对文库进行限制性长度多态性（RFLP）分析。HL、FQ 和 YT 的 *amo*A 基因文库克隆数量分别为 49、50 和 48 个，相应的 RFLP 类型数为 10、10 和 14 个 OTUs，其中有 4 个 OTUs 为三种土壤共有；YT 中氨氧化细菌 *amo*A 基因多样性指数最高，FQ 最低；HL 和 FQ 群落的相似为 70%，HL 与 YT 的相似度为 50%，而 FQ 和 YT 之间仅为 42%，说明氨氧化细菌具有地理分布的规律：17 个 *amo*A 基因序列可以被聚成 6 个 cluster，分属 *Nitrosospira* 和 *Nitrosomonas* 两个属。三种农田土壤中均存在丰富的氨氧化细菌，表明氨氧化细菌在农田土壤氮素循环中具有重要作用。

关键词　氨氧化细菌；*amo*A 基因；RFLP 分析；农田土壤；微生物多样性

中图分类号　Q938　　**文献标识码**　A

氨氧化细菌（Ammonia-oxidizing bacteria，AOB）是一类重要的功能微生物，它通过氨单加氧酶（Ammonia monooxygenase，AMO）的催化作用将氨氧化成羟胺，是硝化作用过程的起始和限速步骤[1]。氨单加氧酶是一种膜结合蛋白，由多种亚基组成，相应的编码基因位于 *amoCAB* 操纵元上[2-3]，其中含有 α 亚基（*amo*A）基因是良好的分子标记，广泛用于环境中 AOB 多样性研究[4]。

土壤中化能自养型 AOB 绝大部分属于 β-变形杆菌（β-*Proteobacteria*），包括亚硝化单孢菌（*Nitrosomonas*）和亚硝化螺菌（*Nitrosospira*）两个属[5]。由于 AOB 生长慢、数量少、代时长，对营养条件的要求专一性很强，这些因素使得人们用传统的培养方法分离与纯化 AOB 有很大的困难[6]。近年来，通过构建 16S rRNA 和 *amo*A 基因文库等方法，对水体、河湖沉积物以及土壤等环境中的 AOB 群落结构进行了大量研究，已经揭示出这些环境中存在着大量的 AOB 类群与数量[7-9]。

土壤与微生物的作用是相互的，土壤的理化性质等差异对 AOB 的多样性造成影响，而 AOB 群落组成和数量的变化，将会影响到土壤的硝化作用，以及土壤氨态氮的氧化，改变土壤中 NH_4^+ 和 NO_3^- 的相对库容，从而影响土壤中氮素的淋失和土壤的酸化。我国的农田土壤广泛分布在东部季风区，南北纬度跨度较大，水热条件以及土壤理化性质在着差异。开展不同气候带土壤 AOB 的比较研究，有助于了解 AOB 群落组成特征，揭示不同气候下农田土壤与 AOB 多样性之间的关系，为采用微生物调控措施提高农田氮素利用效率、保护农田生态环境提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　样品采集地状况及样品采集

利用中国科学院生态系统研究网络（CERN），沿中国东部南北热量梯度带上选择 3 个农田生态系统国家野外科学观测研究站，即海伦、封丘、鹰潭试验站。3 个站点分布有中国典型的农田土壤，东北松嫩平原的海伦为黑土、黄淮海平原的封丘为潮土、南方丘陵区的鹰潭为红壤，上述 3 种土壤分别记为 HL、

* 国家自然科学基金项目（40871125，40871123）资助
† 通信作者，Tel/Fax：+86－25－84396753；E-mail：hcao@njau.edu.cn
作者简介：汪　峰（1982—），男，安徽潜山人，硕士研究生，研究方向为土壤微生物分子生态学。E-mail：2007103022@njau.edu.cn
收稿日期：2011－04－13；收到修改稿日期：2011－08－03

FQ、YT。采集试验小区每年种植一季玉米,采集时间为玉米生长旺盛期,其中海伦黑土采集时间为 2008 年 7 月 28 日、封丘潮土为 2008 年 7 月 30 日,鹰潭红壤为 2008 年 6 月 4 日。各试验小区施肥量为 N 150 kg hm^{-2}、P_2O_5 75 kg hm^{-2}、K_2O 60 kg hm^{-2},NPK 肥料分别为尿素、$(NH_4)_2HPO_4$ 和 KCl。每小区采集 10 点混合土样,用不锈钢土钻(直径 2 cm)钻取 0 ~ 20 cm 耕层土壤,用四分法留取土样,用保鲜箱低温冷藏带回实验室。去除石块和植物根系后,一部分土样风干磨碎进行理化性状的测定,一部分放在 -20℃冰箱中保存,进行微生物群落的研究。采集地区的部分土壤理化性质和气候条件如表 1。

表 1 三种土壤采集地的气候条件和土壤的部分理化性质

Table 1 Physicochemical properties of the three soils in test and local meteorological conditions at their sampling sites

土壤样品 Soils	经纬度 Longitude and latitude	年均温 Annual temperature (℃)	年降雨量 Annual precipitation (mm)	pH	有机质 Organic matter (g kg^{-1})	铵态氮 NH_4^+ - N (mg kg^{-1})	硝态氮 NO_3^- - N (mg kg^{-1})
HL	126°36′E,47°26′N	1.5	550	5.98	50.7	19.7	1.57
FQ	114°32′E,35°01′N	13.9	605	8.52	9.00	10.7	0.99
YT	116°55′E,28°15′N	17.6	1 795	5.21	7.59	1.23	1.84

1.2 菌株、培养基与试剂

大肠杆菌 *E coli* DH5α 为本实验室保存;pMD18-T Vector、限制性内切酶 *Hha*I 和 *Sau*3AI 购自宝生物工程(大连)有限公司;氨苄青霉素(Amp)购自南京赛吉公司。大肠杆菌用 LB 培养基培养,氨苄青霉素(Amp)使用浓度为 100 mg L^{-1};PCR 引物由上海英骏生物技术公司合成;DNA 回收试剂盒购自杭州维特洁公司(V-gene Biotechnology Limited)。

1.3 氨氧化细菌 *amo*A 基因片段的扩增与克隆文库的构建

采用直接法提取自然土壤总 DNA,具体操作步骤参照文献[10]。为了有效地去除总 DNA 中的有机酸等杂质,便于基因序列的 PCR 扩增,采用大片段回收试剂盒纯化回收所获得的土壤总 DNA。采用引物(*amo*A-1F:5′-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3′)和(*amo*A-2R; 5′-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3′[K = G or T; S = G or C])直接扩增总 DNA 中的氨氧化细菌 *amo*A 基因片段[4]。

扩增反应体系:DNA(约 50 ng μl^{-1})1.0 μl,*Taq* 聚合酶 Buffer 2.5 μl,dNTP(20 mmol L^{-1})2.5 μl,引物 *amo*A-1F 和引物 *amo*A-2R(25 pmol μl^{-1})各 1 μl,Mg^{2+}(25 mmol L^{-1})2 μl,*Taq* 酶(5 U μl^{-1})0.25 μl,补无菌水至 25 μl。每个样品扩增 10 管重复,扩增产物均匀混合尽量消除单次扩增的偏向性。

PCR 扩增程序采用梯度降落 PCR 程序。反应条件:95℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 40 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,10 个循环,每个循环降 0.5℃,后再接 20 个循环,50℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物用 0.75% 的琼脂糖凝胶电泳回收,通过 TA 克隆技术将扩增的 *amo*A 基因片段转化到 *E coli* DH5α 中,蓝白斑筛选,每个样品各挑取 50 个阳性克隆子,建立 *amo*A 基因片段克隆文库,克隆文库通过 Amp^r 平板保藏。

1.4 RFLP 分析

采用菌体 PCR 方法,用以上引物重新扩增阳性克隆子中插入的 *amo*A 基因片段,将 PCR 产物分别用 *Hha*I 和 *Sau*3AI 两种限制性内切酶消化(37℃过夜)。利用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离酶切产物,经硝酸银染色、凝胶成像后即为 *amo*A 基因指纹图谱,所得 DNA 带型图谱经过人工比较分析。以基因片段多态图谱为基础进行聚类,聚合到一起的具有相同图谱的克隆需要用第 2 种限制性内切酶进行消化与电泳分离。当第二次所获得的基因图谱仍然相同时,则认为它们是相同的基因型。每一个基因型作为一个分类操作单位(Operational Taxonomic Unit,OTU)。用文氏图(Venn diagram)来反映各文库 OTU 之间的关系,每个矩形表示一个文库,相交部分表示共有的 OTU 类型。

通过计算 Shannon-Wienner、Simpson、Evenness 和 Richness 多样性指数模型获得 AOB 群落多样性指数[11]。

1.5 基因测序和系统发育树的构建

1.5.1 插入片段的序列测定 从三个文库中各挑取其代表酶切类型的克隆子,共挑取 20 个克隆(测定其插入序列全长(491 bp)。序列测定工作委托华大基因股份有限公司公司完成,测序引物为 pMD18-T vector 多克隆位点两端的通用引物(primer RV-M 和 primer M13-4)。

1.5.2 序列登录与比对分析 测序序列登录 NC-

BI(National Center for Biotechnology Information)网站,登录号 GU138125-GU138141,并经 BLAST 分析,与 Genbank 数据库中已存在的序列进行同源性比对。

1.5.3 系统发育分析　经过嵌合体检查后,将确定为非嵌合体的核苷酸序列用 BioEdit v7.0.1 软件转换成氨基酸序列。同时根据 BLAST 同源性比对的结果,从核酸数据库中下载同源性高的 *amo*A 氨基酸序列以及不同分类来源的代表性 *amo*A 氨基酸序列,用 BioEdit v7.0.1 将序列转换为 FASTA 格式。该格式文件用 MEGA4.0 进行分析多序列比对,最后通过邻接法(neighbor-joining)生成系统进化树,根据序列在系统进化树中的位置和遗传距离判定测序克隆的系统发育地位。

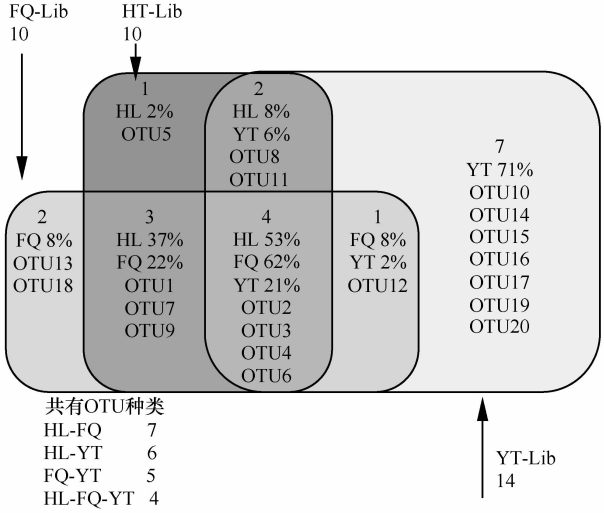
2　结果分析

2.1　*amo*A 基因酶切类型与文库库容

从三种土壤样品中随机挑选了 147 个阳性克隆,采用 *Hha*I 和 *Sau*3AI 联合酶切,经过归类共得到了 20 个 OTUs,其中 HL 和 FQ 各为 10 个 OTUs 而红壤为 14 个 OTUs。每个文库的优势 OTUs 均不相同,HL 为 OTU1,FQ 为 OTU3,而 YT 为 OTU20,其中还存在一些亚优势以及比例较大的 OTUs,反映出 AOB 在三种土壤中的多样性均较高。

从图 1 可以看出,在三种土壤中均存在的 OTUs 共有 4 个,说明有 20% OTUs 与土壤类型无关,同时还有部分 OTUs 仅存于 2 种土壤,如 HL 和 FQ 的 3 个共有类型为 OTU1、OTU7、OTU9 三个。此外,每个土壤中存在着独有的 OTU 类型,如 YT 土壤中独特的 OTUs 高达 7 个,这些 OTUs 的克隆数占 YT 文库的 71%,而 HL 和 FQ 土壤独有的 OTU 类型分别为 1 个和 2 个,说明了 YT 土壤 AOB 群落与 HL 和 FQ 土壤存在较大的差异。

图 2 是三种土壤 *amo*A 基因文库的种系丰富度曲线,可以看出三种文库的趋势线均趋于缓和,即三种文库的库容量达到了比较饱和的程度;同时,HL、FQ 和 YT 土壤基因文库库容值(Coverage C)分别为 96%、98% 和 90%(表 2),表明所建立的基因文库能够比较完整地反映土壤 AOB 群落结构。



注:图中加黑的数字表示OTU个数,下面的百分比表示克隆数占该文库的百分比 Note: The Bold digits mean numbers of OTU, and the percentages below are the percentages of clones in each library

图 1　反映三种农田土壤氨氧化细菌 *amo*A 基因酶切类型关系的文氏图

Fig. 1　Venn diagram showing relationships between the three soils in RFLP pattern-based *amo*A gene OTUs

2.2　*amo*A 基因文库的多样性指数

评价生物多样性的高低时,同时要考虑到物种的丰富度与均一度。环境种群丰富度越高均一度越高,则物种的多样性越高。Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数既考虑到了物种数,同时也考虑到每个物种的相对多度。

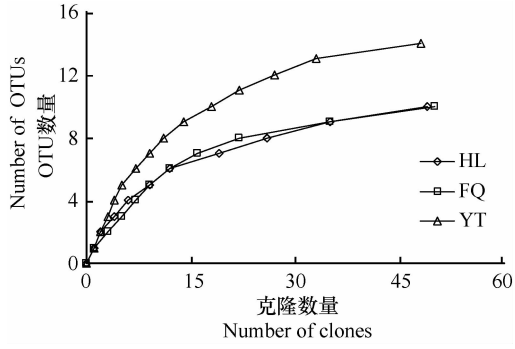


图 2　三种农田土壤氨氧化细菌 *amo*A 基因文库的丰度曲线

Fig. 2　Rarefaction curves of the *amo*A gene libraries of the three farmland soils

从多样性指数来看，YT 的 *amo*A 基因多样性指数最高，FQ 最低，且 HL 和 FQ 的多样性指数比较接近。从均匀度指数和丰富度指数来看，文库的均匀程度均较高。说明三种土壤中的 AOB 群落结构较好地适应了当地的土壤环境，没有受到剧烈的环境胁迫使得其发生单一化。

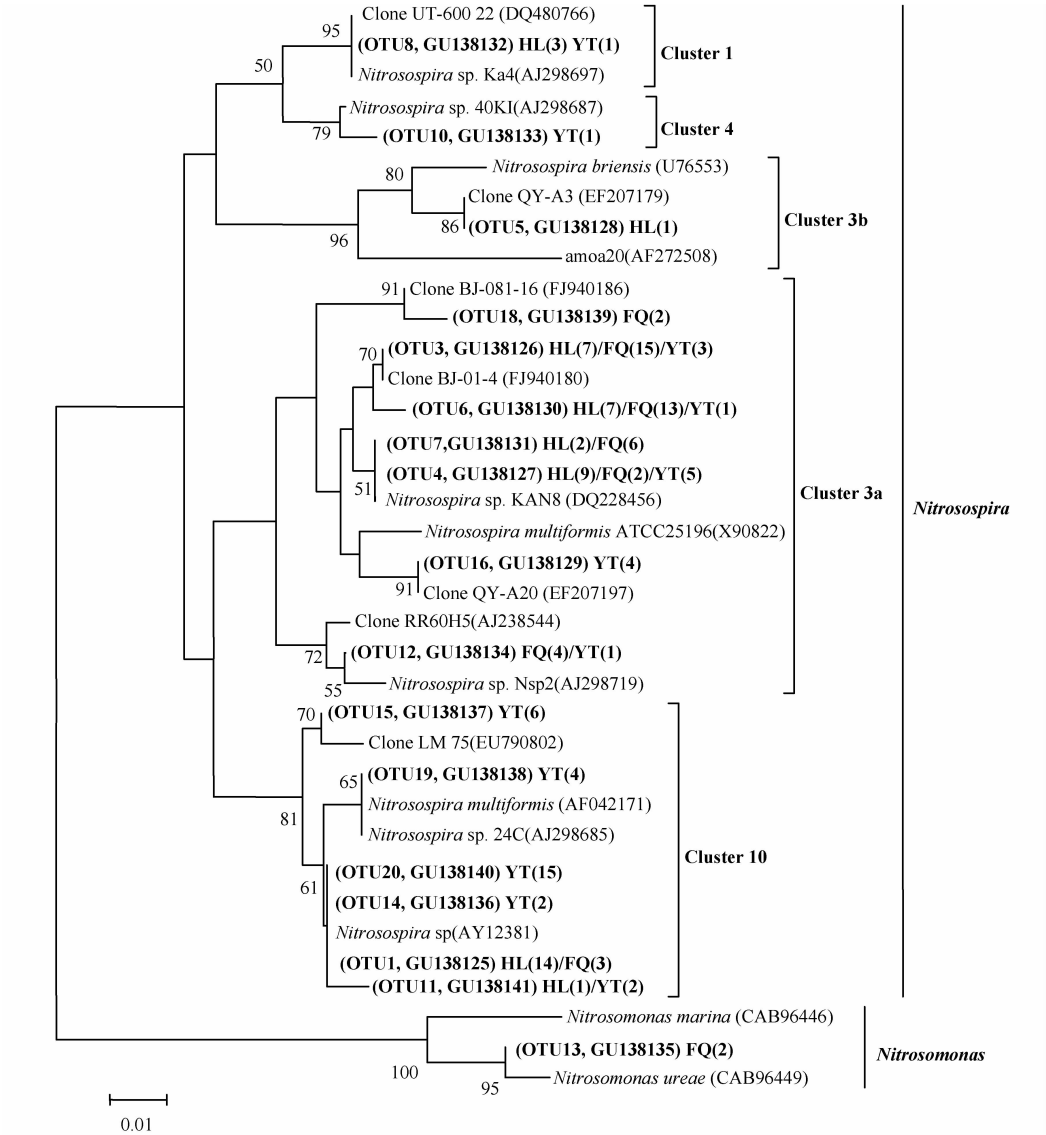
2.3 *amo*A 基因的系统发育分析

通过 NCBI 网站的 BLAST 比对分析，剔出了假阳性克隆，在 20 个 OTUs 中，挑选 17 个有代表性的 OTUs 送去测序，获得了 17 个正确的 *amo*A 基因序列，通过 BioEdit 软件和 Mega 软件将这些序列构建系统进化树（图 3）。

表 2 三种农田土壤氨氧化细菌 *amo*A 基因文库的群落多样性结构指数

Table 2 Structural diversity indices of the *amo*A gene libraries of the three farmland soils

土样 Soils	克隆数 Clones	覆盖度 Coverage	香农指数 Shannon-Wiener index	辛普森指数 Simpson index	均匀度 Evenness	丰富度 Richness
HL	49	96%	1.99	0.83	0.86	2.31
FQ	50	98%	1.93	0.81	0.84	2.30
YT	48	90%	2.25	0.85	0.85	3.36



注：图中加黑的表示测序的OTUs，样品编号后的括号中表示克隆的个数 Note: Sequenced OTUs were shown in bold, and number of clones are enclosed in brackets following sample numbers

图 3 基于三种农田土壤氨氧化细菌 AmoA 氨基酸序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on partial AmoA sequences (163 amino acids) retrieved from the three farmland soils

17 个 *amo*A 基因序列之间的相似度介于 74.3%~99.3%。OTU13 *amo*A 基因序列与其他所有序列相似度均很低(<80%),尤其与 OTU5 克隆序列的相似度仅为 74.3%;而 OTU11 与 OTU14 序列的关系最近,达到 99.3%。

从系统发育树可以看出,各序列之间具有高度的多样性,所有的 *amo*A 测序基因归为两个属 *Nitrosospira* 和 *Nitrosomonas*,6 个 cluster 类群。并且,3 种土壤中绝大部分 AOB 属于 *Nitrosospira*,而 *Nitrosomonas* 较少。

3 讨　论

本研究以 *amo*A 基因作为分子标记,采用 PCR-RFLP 方法研究了我国东部 3 种地带性农田土壤 AOB 群落结构多样性。从 AOB 群落组成来看,3 种地带性农田土壤 AOB 绝大部分 OTUs 属于 *Nitrosospira* 属,只有 FQ 土壤中发现 4% 的克隆属于 *Nitrosomonas* 属。农田土壤以 *Nitrosospira* 作为 AOB 优势类群,在不同类型、不同利用方式土壤环境中均有报道[12-16],褚海燕等[12]用 PCR-DGGE 的方法调查了不同施肥处理下的封丘潮土中 *amo*A 的多样性,而结果显示,所有的 AOB 均属于 *Nitrosospira* 属,本文中检测到 *Nitrosomonas* 而褚海燕等未能发现,表明本文的结果更为可靠,DGGE 仅能检测数量上占优势的物种,而本文中将 10 管 PCR 产物混匀,极可能显著减低了偏嗜性(bias),进一步酶切分析了 50 个克隆的 RFLP 规律,能够更加完整地反映 *amo*A 基因的遗传多样性。此外,本文使用兼并引物,相比褚海燕等使用的非兼并引物,能够发现更多的 AOB 种类。

3 种土壤 AOB 组成存在一定差别,如 HL 土壤 AOB 主要由 cluster 3a 组成(51%),cluster 10 也占有较大比例,为 31%;FQ 土壤 cluster 3a 占绝对优势,达 83%;YT 土壤 cluster 10 和 cluster 3a 分别为 56% 和 21%。这种群落组成的地带性差异,是 AOB 类群与环境条件长期适应的结果,受土壤 NH_4^+ 浓度、溶解 O_2、土壤盐分、土壤 pH 和温度等因素的综合影响[17-20],有研究表明 *Nitrosospira* cluster 3 在 NH_4^+ 浓度高的土壤中占优势[21-22],本试验中 YT 的 NH_4^+ 浓度明显低于 HL 和 FQ,其 cluster 3 不是优势类型,与以上研究结果一致。

我们通过计算 Sorensen 指数比较了 3 种土壤 AOB 群落之间的相似程度。结果表明 HL 和 FQ 之间 AOB 群落之间的相似度最高,达到了 70%;HL 与 YT 的相似度为 50%;而 FQ 和 YT 的相似度仅为 42%。由此可以看出,农田土壤 AOB 组成具有明显的地理分布规律,土壤 AOB 存在一些环境适应性强、全球普遍分布的类群,但大部分 AOB 类群的生长需要特殊的环境条件。

孙波等[23]对该 3 种土壤硝化作用的研究表明,土壤中硝化细菌数和硝化强度大小顺序为:潮土 > 黑土 > 红壤,但没有进一步分析土壤 AOB 群落结构多样性,本文中研究发现 YT 的 AOB 多样性较高。土壤微生物多样性是土壤理化性质以及气候因子综合作用的结果,葛源等[24]发现土壤类型比施肥、采样时间更大程度上决定了土壤微生物多样性,但温度和降雨对微生物多样性的作用尚不清楚。基于植物和动物的生态学代谢理论[25-27](Metabolic Theory of Ecology,MTE)表明热量与生物多样性之间存在一定的相关性,主要表现为:温度越高,细胞的代谢速率就越高,导致基因突变率也相应升高,最后形成较高水平的物种多样性。YT 与 HL 气候带的土壤年均温之差高达 16.1℃,两种土壤的 AOB 组成具有明显差异,然而生态学代谢理论是否适用于大尺度下微生物的地理分布规律仍需更多证据。

我国东部分布有大量的农田土壤,在气候类型上属于季风气候区。由于纬度跨度大、距离远,南北季风气候水热条件相差显著。农田土壤 AOB 数量与群落组成,直接影响 N 素形态转化,因而与土壤肥力质量和土壤环境质量密切相关。我们的研究结果表明,3 种农田土壤中均存在丰富的 AOB 类群,表明 AOB 在农田土壤氮素循环中具有重要作用。

参 考 文 献

[1] Hollocher T C, Tate M E, Nicholas D J D. Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*: Definitive ^{18}O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. The Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(11):10 834—10 836

[2] Norton J M, Alzerreca J J, Suwa Y, et al. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. Archives of Microbiology, 2002, 177:139—149

[3] Junier P, Kim O S, Junier T, et al. Community analysis of betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria using the *amoCAB* operon. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83: 175—188

[4] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amo*A as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. Ap-

plied and Environmental Microbiology, 1997, 63(12): 4 704—4 712

[5] Stephen J R, McCaig A E, Smith Z, et al. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62:4 147—4 154

[6] 胡君利, 林先贵, 褚海燕, 等. 土壤氨氧化细菌的分离方法研究. 土壤, 2005, 37(5):569—571. Hu J L, Lin X G, Chu H Y, et al. Isolation of soil ammonia-oxidizing bacteria (In Chinese). Soils, 2005, 37(5):569—571

[7] Phillips C J, Smith Z, Embley T M, et al. Phylogenetic differences between particle-associated and planktonic ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in the northwestern Mediterranean Sea. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65:779—786

[8] Kim O S, Junier P, Imhoff J F, et al. Comparative analysis of ammonia monooxygenase (*amo*A) genes in the water column and sediment-water interface of two lakes and the Baltic Sea. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 66(2):367—378

[9] 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. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39: 106—115

[10] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316—322

[11] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, et al. Using ecological diversity measure with bacterial communities. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 43: 1—11

[12] 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. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 73:485—491

[13] He J Z, Shen J P, Zhang L M, 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. Environmental Microbiology, 2007, 9: 2 364—2 374

[14] Wang Y N, Ke X B, Wu L Q, et al. 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

[15] Fierer N, Carney K M. The biogeography of ammonia-oxidizing bacterial communities in soil. Microbial Ecology, 2009, 58: 435—445

[16] 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. 土壤学报, 2008, 45(1): 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 ammonium oxidizers diversity and nitrification of red soils (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2008, 45(1): 105—111

[17] Briones A M, Okebe S, Umemiya Y, et al. Influence of different cultivars on populations of ammonia-oxidizing bacteria in the root environment of rice. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 3 067—3 075

[18] Nicolaisen M H, Risgaard-Petersen N, Revsbech N P, et al. Nitrification-denitrification dynamics and community structure of ammonia oxidizing bacteria in high yield irrigated Philippine rice field. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49: 359—369

[19] Avrahami S, Conrad R, Liesack W. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. Environmental Microbiology, 2003, 5: 691—705

[20] Yuan F, Ran W, Shen Q R. Nitrification potential of soils under liquid incubation conditions. Pedosphere, 2005, 15: 379—385

[21] Bruns M A, Stephen J R, Kowalchuk G A, et al. Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65:2 994—3 000

[22] Kowalchuk G A, Stienstra A W, Heilig G H J. Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. Environmental Microbiology, 2000, 2:99—110

[23] 孙波,郑宪清,胡锋,等. 水热条件与土壤性质对农田土壤硝化作用的影响. 环境科学, 2009, 30(1):206—213. Sun B, Zheng X Q, Hu F, et al. Effect of temperature, rainfall and soil properties on farmland soil nitrification (In Chinese). Environmental Science, 2009, 30(1):206—213

[24] Ge Y, He J Z, Zhu Y G, et al. Differences in soil bacterial diversity: Driven by contemporary disturbances or historical contingencies? The ISME Journal, 2008, 2(3):254—264

[25] Brown J H, Gillooly J F, Allen A P. Toward a metabolic theory of ecology. Ecology, 2004, 85:1 771—1 789

[26] Stegen J C, Enquist B J, Ferriere R. Advancing the metabolic theory of biodiversity. Ecology Letters, 2009, 12:1 001—1 015

[27] 王志恒, 唐志尧, 方精云. 生态学代谢理论: 基于个体新陈代谢过程解释物种多样性的地理格局. 生物多样性, 2009, 17:625—634. Wang Z H, Tang Z Y, Fang J Y. Metabolic theory of ecology: An explanation for species richness patterns based on the metabolic processes of organisms (In Chinese). Biodiversity Science, 2009, 17:625—634

COMPARATIVE ANALYSIS OF AMMONIA MONOOXYGENASE (*amo*A) GENE DIVERSITY IN THREE CULTIVATED SOILS

Wang Feng[1,2,3,4]　Qu Haoli[1]　Ding Yufang[1]　Sun Bo[3]　Cui Zhongli[1]　Cao Hui[1†]

(1 *Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment*, *MOA*, *Nanjing Agricultural University*, *Nanjing* 210095, *China*)

(2 *College of Resources and Environmental Sciences*, *Nanjing Agricultural University*, *Nanjing* 210095, *China*)

(3 *Institute of Soil Science*, *Chinese Academy of Sciences*, *Nanjing* 210008, *China*)

(4 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*)

Abstract To analyze by comparison AOB *amo*A gene diversity of three cultivated soils, i. e. black soil in Hailun (HL), chao soil in Fengqiu (FQ) and red soil in Yingtan (YT) which are located in different climatic zones in East China. Total DNA of soil microbe was extracted by the direct lysis method, and amplified with specific primers of AOB *amo*A gene, *amo*A gene libraries of the three soils were thus constructed and analyzed with the RFLP method for diversity. The number of clones in *amo*A gene library was 49, 50 and 48 in HL, FQ and YT respectively, and their corresponding number of OTU (Operational Taxonomic Unit) was 10, 10 and 14, of while 4 were common in all the three samples. YT was the highest in index of *amo*A gene diversity while FQ the lowest; The similarity index between HL and FQ in AOB community was 70%, between HL and YT was 50%, and between FQ and YT was 42%, which indicates that AOB distribution has geographic characteristics. Seventeen AOB *amo*A gene sequences could be sorted into six clusters belonging to two genera, *Nitrosospira* and *Nitrosomonas*. All the three soils have an abundance of AOB, thus implying autotrophic AOB play a crucial role in nitrogen cycling in cultivated soils.

Key words Ammonia-oxidizing bacteria; Ammonia monooxygenase gene (*amo*A); RFLP analysis; Cultivated soils; Microbial diversity