

# 桂西北不同植被恢复阶段土壤氨氧化细菌遗传多样性研究\*

梁月明<sup>1,2,3</sup> 苏以荣<sup>1,3</sup> 张伟<sup>1,3</sup> 陈香碧<sup>1,3</sup> 刘淑娟<sup>1,2,3</sup>  
黎蕾<sup>1,2,3</sup> 冯书珍<sup>1,2,3</sup> 何寻阳<sup>1,3†</sup>

(1 中国科学院亚热带农业生态研究所亚热带农业生态过程重点实验室, 长沙 410125)

(2 中国科学院大学, 北京 100049)

(3 中国科学院环江喀斯特农业生态试验站, 广西环江 547100)

**摘要** 以桂西北喀斯特不同植被恢复阶段(草丛、灌木林、次生林、原生林)生态系统为研究对象,运用分子生物学技术分析了土壤氨氧化细菌 *amoA* 功能基因多样性,探讨了其与脲酶活性和土壤理化性质的关系。结果显示,随着植被的恢复,土壤氨氧化细菌多样性指数与均匀度指数呈增大趋势(灌木林例外),且土壤中氨氧化细菌群落结构发生了改变:主要表现在因 *Nitrosospira* 3 簇种群对铵态氮浓度敏感度差异导致其在 3a、3b 簇中分布不一致;相关分析表明:土壤脲酶活性与铵态氮浓度呈正相关关系,土壤脲酶可能通过影响铵态氮浓度改变氨氧化细菌多样性,但植被恢复后期土壤铵态氮浓度减少并未降低土壤氨氧化细菌多样性。LIBSHUFF 和 RDA 分析揭示,植被类型和土壤脲酶活性及 pH 与氨氧化细菌群落结构紧密相关,说明植被和土壤氮素有效性以及 pH 可能是决定土壤氨氧化细菌多样性的主要因子,为深入理解喀斯特地区土壤氮素循环提供了一定的科学依据。

**关键词** 氨氧化细菌;喀斯特;脲酶活性;氮素;植被恢复

**中图分类号** S154.3; Q938.1

**文献标识码** A

石漠化是制约我国西南地区可持续发展的重大生态环境问题,其治理的关键是恢复植被<sup>[1]</sup>。虽然喀斯特地区土壤中的全氮含量并不比其他地区低<sup>[2]</sup>,但喀斯特高钙镁降低了土壤中氮素有效性,使其不易被植物和土壤微生物利用;且喀斯特地貌具有独特的二元水文过程,土壤中的植物与微生物可利用的有效氮养分易随降雨快速入渗进入地下水系,造成地下水污染<sup>[1]</sup>。因此,认识喀斯特地区土壤氮素转化过程及其驱动因素,不仅有利于喀斯特地区植被的恢复,而且可降低氮素迁移导致的地下水污染风险,提高区域环境与生态安全。

土壤氨氧化细菌是全球氮素循环硝化过程中的关键执行者之一<sup>[3]</sup>。氨氧化细菌以氨态氮作为底物,通过氨氧化获得能量以维持生命活动,因此,其细胞生长受到土壤铵态氮含量的影响<sup>[4]</sup>;另一方面,土壤铵态氮浓度不仅与土壤脲酶活性相关,且

常用于评估土壤脲酶活性高低<sup>[5-7]</sup>。研究显示,随着植被的自然恢复,土壤脲酶活性逐渐降低且与土壤碱解氮、全氮呈极显著负相关<sup>[8]</sup>;土壤质量得到不断改善<sup>[9]</sup>,土壤细菌的碳代谢功能加强<sup>[10]</sup>。但是,植被自然恢复过程对土壤氨氧化细菌多样性及其硝化功能的影响研究较少,目前对喀斯特土壤氮素营养及退化生境生态恢复的微生物过程仍缺乏了解。因此,本文运用土壤氨氧化细菌 *amoA* 功能基因克隆技术研究不同植被恢复生态系统中土壤氨氧化细菌多样性,探讨其与土壤脲酶活性及铵态氮浓度之间关系,以期为提高喀斯特地区土壤氮素有效性及土壤氮素循环利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区概况

研究区域位于广西省环江县古周移民迁出示范

\* 中国科学院知识创新重要方向项目(KSCX2-YW-JC403)、中国科学院战略性先导科技专项(XDA05070403)、国家科技支撑计划项目(2012BAD05B03-03)和中国科学院西部之光(2009-2011)项目联合资助

† 通讯作者, E-mail: hbhbjhn@isa.ac.cn

作者简介:梁月明(1983—),女,博士研究生,主要从事土壤环境生态和微生物分子生态学。E-mail:yueming0919@163.com

收稿日期:2012-06-10;收到修改稿日期:2012-10-13

区与木论国家自然保护区。古周移民迁出示范区位于广西环江毛南族自治县下南乡西南部(24°50' N, 107°55' E)。区域内最低点海拔为 376 m, 与最高点海拔相差 440 m。该地区属于亚热带季风气候, 年均气温 16.5 ~ 20.5℃, 年均降雨量为 1 389 mm, 雨季平均持续 130 ~ 140 d, 主要集中在 4—9 月; 尤以 6 月中旬至 7 月中旬最多, 达 350 ~ 460 mm, 常出现涝灾; 10 月至次年 3 月为旱季, 各月平均降水量在 90 mm 以下。一年内日照时数以 2 月份最低, 7 月份最高; 日照率以 3 月份最低, 9 月份最高。木论国家自然保护区(107°53' ~ 108°05' E, 25°06' ~ 25°12' N) 与古周研究区相距 30 km, 属于亚热带季风气候区, 年均气温 15.0℃ ~ 18.7℃, 极端高温 36℃, 极端低温 -5℃。年均降雨量 1 675 mm, 雨季主要集中在 4—8 月。木论自然保护区内草、灌、乔均有分布, 其中草丛优势种主要以五节芒 (*Miscanthus floridulus*)、类芦 (*Neyraudiareynaudiana*)、白茅 (*Imperata cylindrica*) 等为主; 灌丛优势种主要为红背山麻杆 (*Alchornea trewioides*)、灰毛浆果楝 (*Cipadessa cinerascens*)、盐肤木 (*Rhus chinensis*)、聚果羊蹄甲 (*Bauhinia brachycarpa var. cavaleriei*); 乔木林主要优势种为香椿 (*Toona sinensis*)、皂荚树 (*Gleditsia sinensis Lam*)、菜豆树 (*Radermachera sinica*)、聚果羊蹄甲 (*Bauhinia brachycarpa var. cavaleriei*)、粉苹婆 (*Sterculia euosma*)、广西密花树 (*Rapanea kwangsiensis*) 等, 乔木林内伴生有扁担藤 (*Tetrastigma planicaule*)、藤黄檀 (*Dalbergia hancei*) 等藤本及麒麟尾 (*Epipremnum pinnatum*)、肾蕨 (*Nephrolepis cordifolia*) 等林下物种。

### 1.2 样地情况及样品采集

在研究区选取典型的峰丛洼地单元, 采用空间代替时间研究方法于 2009 年 12 月选取不同植被恢复阶段草丛(T)、灌木林(S)、次生林(SF), 原生林(PF) 作为标准样地。其中, 草丛有 8 ~ 15 年的退耕历史; 灌木林为乔灌混交林, 有 30 ~ 50 年的退耕历史; 次生林部分封育 50 多年, 偶有砍柴; 原生林内无种植历史, 受人类活动干扰较少。为保证样地具有代表性, 每种植被类型选取 3 条不同坡向沿坡向上的样线, 分别在上、中、下坡各设置一个样方(20 m × 30 m), 共 9 个样方。研究区 4 种植被类型共计 36 个样方。采样时用 GPS 记录每个样点(或样地中心)的经纬度、高程等地理信息, 同时调查记录各样点的坡度、坡向、利用历史、裸岩率等环境信息。

考虑到喀斯特土壤的高度异质性, 为得到具有

代表性的土壤样品, 每个样方分成 4 个小区, 在每个小区内沿“S”形采集 5 ~ 8 点表层 0 ~ 15 cm 的土壤样品, 将 4 个小区的土壤样品充分混匀成一个混合样(代表整个样方), 共计 36 个土壤样品。然后, 用四分法将混合土壤样品分成三部分, 一部分用锡箔纸包好放入灭菌布袋后立即投入液氮速冻, 带回实验室, -70℃ 保存用于分子生物学分析; 一部分 4℃ 保存用于土壤微生物生物量的测定; 剩余风干保存用于土壤脲酶等土壤理化性质分析。

### 1.3 土壤理化指标测定方法

土壤理化性质检测方法具体如下: 土壤 pH: pH 计测定(土水比为 1:2.5); 有机碳: 重铬酸钾容量法; 铵态氮与硝态氮: 1 mol L<sup>-1</sup> 氯化钾(KCl) 浸提, 分光光度计测定; 脲酶活性: 苯酚-次氯酸钠比色法<sup>[11]</sup>; 含水量: 烘干法; 全氮: 半微量开氏法-流动注射仪; 微生物生物量碳、氮: 氯仿熏蒸-K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 法<sup>[12]</sup>。土壤基本理化性质见表 1。

### 1.4 DNA 提取、*amoA* 基因片段扩增、克隆、酶切和测序

采用改进的 SDS-GITC-PEG 法提取土壤微生物总 DNA<sup>[13]</sup>。每种植被类型 9 个样品分别提取 DNA, 利用氨化细菌 *amoA* 基因引物对 *amoA*-1F [5'-GGGTTTCTACTGCTGCTGCT-3'] 和 *amoA*-2R [5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3']<sup>[14]</sup> 进行 PCR 扩增, 目的片段为 550 bp。PCR 扩增反应体系(50 μl): Mix(天根) 25 μl, 10 μmol L<sup>-1</sup> 上下游引物各 2 μl, 模板 50 ~ 100 ng 补水至 50 μl。然后 9 个样品的 PCR 产物混合为一个大样品构建克隆文库。

“降落”PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 40 s, 72℃ 40 s, 10 个循环; 94℃ 30 s, 58℃ 40 s, 72℃ 40 s, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 扩增反应仪: Eppendorf Mastercycler。

用试剂盒(Wizard SV Gel and PCR clean-up Systems, Promega) 进行切胶回收纯化, 并根据说明, 采用 pGEM-T 载体试剂盒(Promega Corp, USA) 对纯化的目的片段进行克隆, 转化至大肠杆菌(DH-5α) 中。挑选白斑, 用载体 pGEM-T 特异性引物 T7 与 SP6 对克隆产物进行 PCR 扩增, 经电泳筛选有期望大小片段的克隆, 每个植被类型选择 70 ~ 80 个预期大小片段的克隆子进行测序(华大基因测序公司)。将测得的所有序列与 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中的 *amoA* 基因序列比对获得目的序列, 对所获得的目的序列用 ClustalX (1.83) 软件进行比对, 将相似度大于 97 % 的序列

归为同一个操作单元 (OTU), 即同一型。氨氧化细菌克隆文库稀疏曲线显示: 每种植被类型挑选 70 ~ 80 个氨氧化细菌阳性克隆构建的克隆文库已接近平台期 (图 1)。

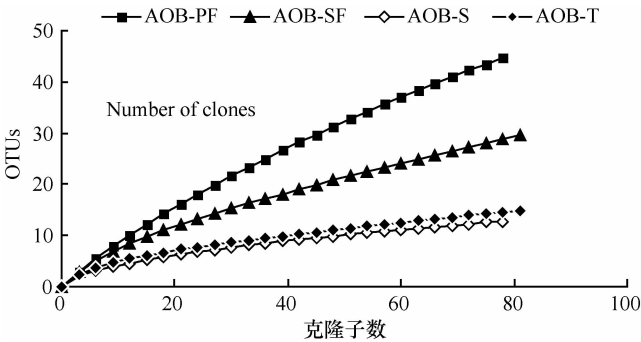


图 1 不同植被恢复阶段生态系统土壤氨氧化细菌 *amoA* 基因克隆文库稀疏曲线图

Fig. 1 Curve of clone libraries of ammonia-oxidizing bacteria *amoA* in soils from ecosystems different in vegetation restoration stage

## 1.5 多样性计算方法

借助群落生态学研究方法, 以  $\alpha$  多样性指数及稀疏 (EstimateSwin7.51) 曲线反映氨氧化细菌 *amoA* 基因多样性, 其中  $\alpha$  多样性指数公式如下:

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$$

$$E = H/H_{\max}, H_{\max} = \ln S$$

式中,  $P_i$  为某个 OTU 含有的克隆子数占总克隆子数的比例;  $S$  为总 OTU 数。

## 1.6 数据处理

利用 LIBSHUFF 软件 (<http://LIBSHUFF.mib.uga.edu/>) 比较不同植被类型克隆文库间微生物组成的差异。此软件以 95% 为置信度, 即: 当  $p < 0.05$ , 两个文库间基因组成显著性差异, 当  $p > 0.05$  则表明两个文库间基因组成没有显著性差异<sup>[15]</sup>。采用 Canoco 4.5 软件的冗余分析 (redundancy analysis, RDA) 方法对影响氨氧化细菌群落组成的土壤因子进行排序分析。利用软件 ClustalX (1.83) 进行序列比对, 然后利用软件 MEGA (4.0) 中的邻接法 (Neighbor-Joining) 建立氨氧化细菌 *amoA* 基因的系统发育树, 进行系统发育分析。本研究获得序列提交 GenBank 数据库, 数据库登录号为 HM346071-HM346159。

## 2 结果

### 2.1 不同植被恢复阶段土壤理化性质差异

随着植被的恢复, 土壤养分发生明显的变化。其中, 脲酶活性表现为草丛 > 灌木林 > 次生林 > 原生林; 铵态氮含量表现为灌木林 > 草丛 > 次生林 > 原生林; 微生物生物量碳、氮含量表现为灌木林 > 原生林 > 次生林 > 草丛; C/N 表现为草丛 > 灌木林 > 原生林 > 次生林 (表 1)。

相关分析表明, 土壤脲酶活性与  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、SMBN、SMBC、SOM、TN 等均呈极显著负相关 ( $p < 0.01$ ), 与 C/N 呈正相关 ( $p < 0.05$ )。

表 1 不同植被恢复阶段生态系统土壤 (0 ~ 15 cm) 理化性质及土壤氨氧化细菌多样性

Table 1 Physico-chemical properties and ammonia-oxidizing bacteria genetic diversity of soils (0 ~ 15 cm) from lands different in vegetation restoration stage

植被类型 Vegetation type	有机质 OM (g kg <sup>-1</sup> )	全氮 Total N (g kg <sup>-1</sup> )	C/N	pH	土壤微生物 生物量碳 SMBC (mg kg <sup>-1</sup> )	土壤微生物 生物量氮 SMBN (mg kg <sup>-1</sup> )	脲酶 URE (mg g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
T	29.26c	2.53c	11.85a	6.82c	551.7c	60.14d	0.50a
S	62.20b	6.67b	9.48b	6.76b	1366a	140.8a	0.41ab
SF	58.43b	6.87b	8.84c	7.18ab	699.2b	100.6c	0.36ab
PF	82.39a	8.97a	9.19bc	7.22a	1322a	120.6b	0.18b

植被类型 Vegetation type	铵态氮 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg kg <sup>-1</sup> )	硝态氮 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg kg <sup>-1</sup> )	克隆子数 Number of clones	OTUs 数量 Number of OTUs	多样性指数 (H) Shannon index	均匀度指数 (E) Evenness index
T	15.89b	26.78c	82	15	2.71	0.69
S	36.90a	26.78c	80	13	1.57	0.61
SF	10.67c	124.4b	83	29	2.82	0.83
PF	9.11c	124.4b	83	42	3.42	0.89

注: T: 草丛; S: 灌木林; SF: 次生林; PF: 原生林; 下同。表中同列相同字母表示差异未达显著水平 ( $p > 0.05$ , 邓肯法) Note: T: tussock; S: shrub; SF: secondary forest; and PF: primary forest and the same below. Values affixed with the same letter in the same column are insignificant in difference ( $p > 0.05$ , Duncan's method)

## 2.2 不同植被恢复阶段土壤氨氧化细菌多样性及优势种差异

不同植被恢复阶段土壤氨氧化细菌均匀度指数与多样性指数变化趋势一致,原生林最大,次生林与草丛次之,灌木林最小(表1)。稀疏曲线也显示出相似的结果(图1)。不同植被恢复阶段土壤中均存在氨氧化细菌优势种(克隆子数占总克隆子数的5%以上的OTU),但各个克隆文库中不同优势种的克隆子数占的比例明显不同(图2)。其中,草丛阶段,T-OTU-1和T-OTU-2克隆子数占该文库克隆子数的比例分别高达22%、19.5%;灌木林阶段,S-OTU-1和S-OTU-6克隆子数占该文库克隆子数的比例分别高达52.5%、22.5%(图2);次生林阶段,SF-OTU-1克隆子数占该文库克隆子数的比例为18.1%(图2);原生林阶段,PF-OTU-1克隆子数占该文库克隆子数的比例为13.6%(图2)。图2还显示 *amoA* 基因在4种植被类型土壤中都出现了重叠OTU(4种植被类型土壤中都出现的OTU),均属于优势种(T/S/SF/PF-OTU-1),说明不同植被类型土壤对某些氨氧化细菌优势种丰度无明显影响。

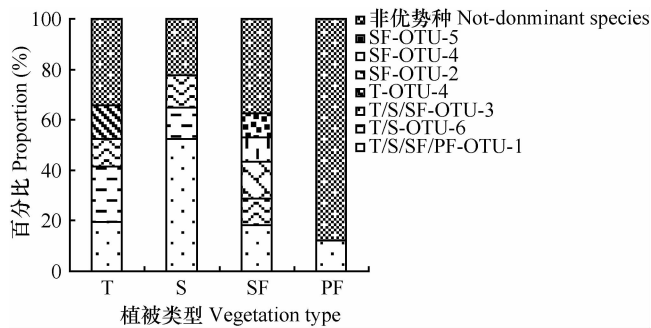


图2 不同植被恢复阶段生态系统土壤氨氧化细菌优势种

Fig. 2 Dominant species of ammonia-oxidizing bacteria in soils from ecosystems different in vegetation restoration stage

## 2.3 植被不同恢复阶段土壤氨氧化细菌群落结构及差异

不同植被恢复阶段土壤中克隆的 *amoA* 基因型大部分序列与 GenBank 中已知的序列相似,但这些序列多为未培养的菌种,且这些序列与 *Nitrosomonas* 亲缘关系比较远(图3),说明本研究获得的菌种有可能均属于未知的 *Nitrosospira*-like。基于 *amoA* 基因型的系统发育树表明,氨氧化细菌主要分为两大类,其中2/3的克隆子与 *Nitrosospira* 3a类群高度相似,其亲缘菌为 *Nitrosospira multififormis* ATCC 25196 和 *Nitrosospira* sp. NPAV;其他克隆子与 *Nitrosospira* 3b类群氨氧化菌高度相似(图3),其亲缘菌为 *Ni-*

*trosospira* sp. 39-19。其中, *Nitrosospira* 3a 簇主要由原生林土壤氨氧化细菌克隆子组成,除了3个克隆子为次生林外; *Nitrosospira* 3a 簇包含了4种植被类型土壤氨氧化细菌克隆子(图3)。

LIBSHUFF 分析显示,不同植被恢复阶段土壤氨氧化细菌群落组成存在显著性差异,表明植被覆盖影响了土壤氨氧化细菌群落组成( $p < 0.01$ )。

## 2.4 不同植被恢复阶段土壤氨氧化细菌群落组成的影响因子

在 RDA 排序图中,箭头代表土壤因子(即土壤理化性质指标),圆圈代表待解释变量(即样方内土壤氨氧化细菌群落组成)。土壤因子箭头的长短代表土壤因子对待解释变量影响程度的大小;待解释变量与土壤因子箭头夹角的余弦值表示该变量与土壤因子之间的相关性。因此,根据环境因子箭头长度和方向确定不同环境变量和2个排序轴的关系;长度越长、与排序轴夹角越小的向量代表的环境变量表示其与这一排序轴的关系越紧密<sup>[16]</sup>。

RDA 分析结果显示,脲酶活性、C/N 与 pH 是影响土壤氨氧化细菌群落组成的主要土壤因子(图4)。

## 3 讨论

### 3.1 不同植被恢复生态系统土壤铵态氮浓度与土壤脲酶活性的变化

相对于硝态氮源,某些植物更偏好于铵态氮<sup>[17-18]</sup>,在一定程度上解释了土壤铵态氮浓度随植被恢复程度减少的现象(灌木林例外)。同时,微生物生长利用铵态氮也可能导致土壤铵态氮浓度降低。此外,土壤脲酶活性与土壤有机氮水解紧密相关,也可能影响土壤铵态氮浓度变化<sup>[19]</sup>。研究表明,土壤脲酶活性与土壤铵态氮浓度呈正相关关系<sup>[20]</sup>,与本文的结果一致,表明随着植被的恢复,土壤脲酶活性与土壤铵态氮浓度逐渐减少。我们推测当土壤铵态氮浓度高于阈值时,土壤不需要如此多的脲酶水解有机氮即可满足植物与微生物的生长发育需要,土壤铵态氮浓度低可能不会刺激脲酶的分泌。本研究发现随着植被的恢复,土壤脲酶活性减弱,铵态氮浓度减少,而氨氧化细菌多样性逐渐增大,一定程度上验证了这一假设。然而,土壤有机氮的矿化可能具有更多的途径。有研究发现土壤氨氧化古菌具有脲酶水解功能,能够水解尿素为氨氧化细菌生长提供能量<sup>[21]</sup>。因此,随着植被的恢复,

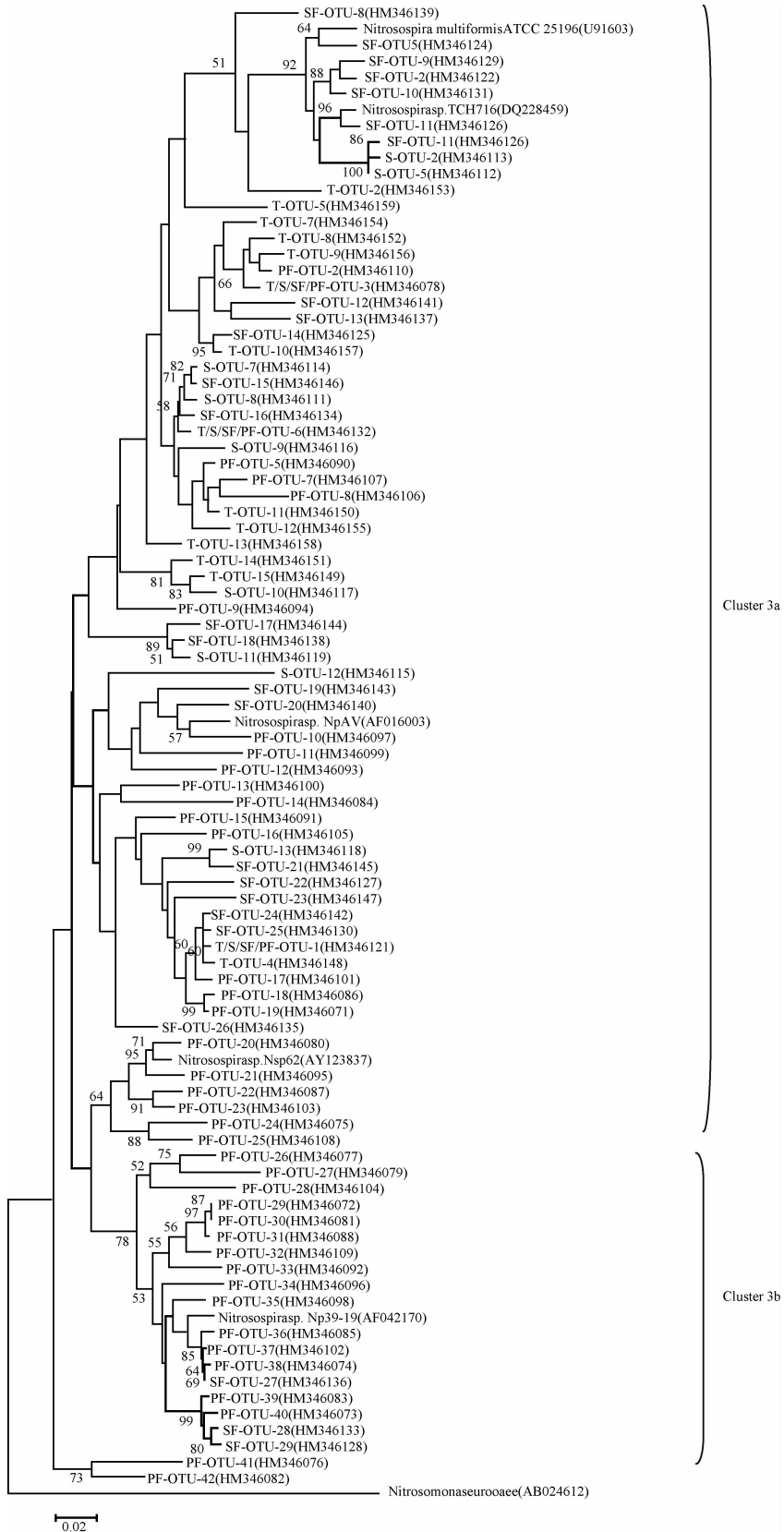


图 3 不同植被阶段生态系统土壤氨氧化细菌系统发育树分析(括号内为序列号)

Fig. 3 Phylogenetic tree of ammonia-oxidizing bacteria from ecosystems different in vegetation restoration stage

(HM + number represents accession numbers for the clones)

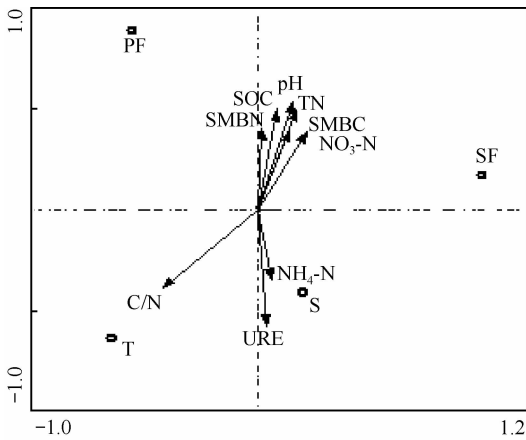


图4 不同植被恢复阶段生态系统土壤氨氧化细菌群落结构的 RDA 分析(箭头代表土壤因子,圆圈代表样方内的氨氧化细菌群落组成)

Fig. 4 Redundancy analysis (RDA) of ammonia-oxidizing bacteria community structure in soils from ecosystems different in vegetation restoration stage (arrow represents soil factor and circle ammonia-oxidizing bacteria community composition in a quadrat)

土壤脲酶活性减低,并不一定限制土壤氨氧化细菌的生长,这与本研究得到的随着植被的恢复土壤氨氧化细菌多样性呈增大趋势结果一致。

### 3.2 不同植被恢复生态系统中影响土壤氨氧化细菌群落结构及多样性的因子

不同植被恢复阶段,土壤氨氧化细菌群落组成存在显著差异(图3)。植被恢复早期土壤铵态氮浓度高,仅检测到氨氧化细菌 *Nitrosospira* 3a 簇的亲缘属,主要原因可能是 *Nitrosospira* 3a 簇适合生存在铵态氮浓度高的环境中<sup>[22]</sup>。原生林土壤铵态氮浓度较低,并检测到氨氧化细菌 *Nitrosospira* 3b 簇的亲缘属,可能原因为 *Nitrosospira* 3b 簇种群生理生态特征有异于 *Nitrosospira* 3a 簇,适宜于在低浓度铵态氮环境中生长。有研究表明植被覆盖是驱动氨氧化细菌群落结构发生变化的一个重要因素,主要表现为植物通过有机物的输入来影响土壤潜在硝化势从而改变氨氧化细菌群落组成<sup>[23-24]</sup>。

Yeager 等<sup>[22]</sup>认为,土壤中可利用铵态氮浓度影响土壤氨氧化细菌群落结构,主要表现为氨氧化细菌的 *Nitrosospira* 3a 簇类群偏好铵态氮浓度高的环境中,而 *Nitrosospira* 3b 簇类群适宜于铵态氮浓度低且人为干扰比较少的环境。本研究得到与其一致的结果,表明土壤中可利用氮素可能影响氨氧化细菌的群落结构。此外,我们还发现随着植被的恢复,土壤氨氧化细菌多样性与均匀度逐渐增大,但灌木林例外。这个结果可能与土壤氨氧化细菌竞

争可利用氮素有关。研究表明,土壤 C/N 比值高,促进土壤异养微生物生长发育,当土壤营养元素处于较高水平下异养微生物处于竞争优势,可能抑制土壤自养微生物生长,降低自养微生物多样性<sup>[25]</sup>。灌木林土壤 C/N 比值与铵态氮浓度较高,而氨氧化是氨氧化细菌获得能源的唯一途径,在高浓度铵态氮环境中,异养微生物极易与氨氧化细菌竞争底物,导致氨氧化细菌多样性降低<sup>[25-26]</sup>。灌木林土壤微生物生物量高在一定程度上可以解释这种现象。还有另一种解释是:灌木林土壤氨氧化细菌优势种群(S-OTU-1 克隆子数占整个克隆文库的 52.5%)在整个群落中占绝对优势地位,结果可能是优势种群竞争性抑制了非优势种群的生长繁殖,导致氨氧化细菌多样性指数和均匀度均减少<sup>[27]</sup>。

土壤 pH 强烈影响氨氧化细菌群落结构<sup>[23]</sup>,而且不同 pH 区间主要氨氧化细菌的类群具有明显差异<sup>[28]</sup>。本试验区土壤呈中性,pH 范围为 6.76 ~ 7.22,所获得的氨氧化细菌 *amoA* 基因与 *Nitrosospira* 属的 3a、3b 簇高度相似,与 Stephen 等<sup>[29]</sup>报道的 *Nitrosospira* 属 3 簇主要分布在中性土壤中结果一致。已有的大量研究表明 *Nitrosospira* 是土壤氨氧化菌的优势种群<sup>[30-31]</sup>,与本研究结果一致。此外,尽管本研究中未能检测到与 *Nitrosomonas* 属高度相似的氧化细菌 *amoA* 基因序列,但并不能排除不同植被类型中存在极少量的 *Nitrosomonas* 属氨氧化细菌,这些数量上不占优势的微生物无法通过传统的克隆文库技术检测。

## 4 结 论

本文采用分子生物学技术研究了不同植被恢复阶段土壤中氨氧化细菌多样性变化规律,结果表明:土壤氨氧化细菌多样性随着植被的恢复逐渐增加(灌木林例外),而且不同植被恢复生态系统土壤氨氧化细菌群落结构组成发生了显著改变。研究结果为深入探讨不同恢复生态系统土壤氨氧化细菌及其功能提供较好的依据,未来仍需进一步深入研究氨氧化古菌的生理生态特性,准确区分细菌与古菌在土壤氨氧化过程和氮循环过程的相对贡献率。

## 参 考 文 献

- [1] Wang S J, Liu Q M, Zhang D F. Karst rocky desertification in southwestern China: Geomorphology, landuse, impact and reha-

- bilitation. *Land Degrad Dev*, 2004, 15: 115—121
- [ 2 ] 李思亮, 刘丛强, 肖化云. 地表环境氮循环过程中微生物作用及同位素分馏研究综述. *地质地球化学*, 2002, 30(4): 40—46. Li S L, Liu C Q, Xiao H Y. Microbial effect on nitrogen cycle and nitrogen isotope fractionation on the earth's surface: A review (In Chinese). *Geology Geochemistry*, 2002, 30(4): 40—46
- [ 3 ] Kowalchuk G A, Stephen J R, De Boer W, et al. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta-subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microb*, 1997, 63: 1489—1497
- [ 4 ] Hättenschwiler S, Tiunov A V, Scheu S. Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Annu Rev Ecol Evol S*, 2005, 36: 191—218
- [ 5 ] Costa E, Pérez J, Kreft J U, et al. Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends Microbiol*, 2006, 14(5): 213—219
- [ 6 ] 潘根兴, 曹建华. 表层带岩溶作用: 以土壤为媒介的地球表层生态系统过程——以桂林峰丛洼地岩溶系统为例. *中国岩溶*, 1999, 18(4): 288—295. Pan G X, Cao J H. Karstification in epikarst zone: The earth surface ecosystem processes taking soil as a medium—case of the Yaji Karst experiment site, Guilin (In Chinese). *Carsologica Sinica*, 1999, 18(4): 288—295
- [ 7 ] Kaçaroğlu F. Review of groundwater pollution and protection in Karst areas. *Water, Air and Soil Pollution*, 1999, 113: 337—356
- [ 8 ] 刘淑娟, 张伟, 王克林, 等. 桂西北喀斯特峰丛洼地不同植被演替阶段的土壤脲酶活性. *生态学报*, 2011, 31(19): 5789—5796. Liu S J, Zhang W, Wang K L, et al. Soil urease activity during different vegetation successions in Karst peak-cluster depression area of northwest Guangxi, China (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(19): 5789—5796
- [ 9 ] 梁月明, 何寻阳, 苏以荣, 等. 喀斯特峰丛洼地植被恢复过程中土壤微生物特性. *生态学杂志*, 2010, 29(5): 917—922. Liang Y M, He X Y, Su Y R, et al. Dynamic changes of soil microbial properties in Karst peak-cluster depression area during vegetation restoration (In Chinese). *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(5): 917—922
- [ 10 ] 何寻阳, 王克林, 徐丽丽, 等. 喀斯特地区植被不同演替阶段土壤细菌代谢多样性及其季节变化. *环境科学学报*, 2008, 28(12): 2590—2596. He X Y, Wang K L, Xu L L, et al. Soil microbial metabolic diversity and its seasonal variations along a vegetation succession in a Karst area: A case study in southwest China (In Chinese). *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(12): 2590—2596
- [ 11 ] Yang C L, Sun T H, Zhou W X, et al. Single and joint effects of pesticides and mercury on soil urease. *J Environ Sci-China*, 2007, 19: 210—216
- [ 12 ] 吴金水, 林启美, 黄巧云, 等. 土壤微生物量测定方法及其应用. 北京: 气象出版社, 2006. Wu J S, Lin Q M, Huang Q Y, et al. Soil microbial biomass—Methods and application (In Chinese). Beijing: China Meteorological Press, 2006
- [ 13 ] 陈香碧, 苏以荣, 何寻阳, 等. 不同干扰方式对喀斯特生态系统土壤细菌优势类群—变形菌群落的影响. *土壤学报*, 2012, 49(2): 354—362. Chen X B, Su Y R, He X Y, et al. Effect of human disturbance on composition of the dominant bacterial group *proteobacteria* in Karst ecosystems (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2012, 49(2): 354—362
- [ 14 ] Ritthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microb*, 1997, 63: 4704—4712
- [ 15 ] Singleton D R, Furlong M A, Rathbun S L, et al. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl Environ Microb*, 2001, 67: 4374—4376
- [ 16 ] Steenwerth K L, Jackson L E, Carlisle E A, et al. Microbial communities of a native perennial bunchgrass do not respond consistently across a gradient of land-use intensification. *Soil Biol Biochem*, 2006, 38: 1797—1811
- [ 17 ] Glass A D M, Britto D T, Kaiser B N, et al. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *J Exp Bot*, 2002, 53: 855—864
- [ 18 ] Rennenberg H, Dannenmann M, Gessler A, et al. Nitrogen balance in forest soils: Nutritional limitation of plants under climate change stresses. *Plant Biology*, 2009, 11: 4—23
- [ 19 ] 邱珊莲, 周易勇. 不同培养基对湖泊氨氧化细菌 MPN 计数的影响. *微生物学通报*, 2008, 35(10): 1668—1673. Qiu S L, Zhou Y Y. Effect of different media on MPN estimation of ammonia—oxidizing bacteria in lakes (In Chinese). *Microbiology*, 2008, 35(10): 1668—1673
- [ 20 ] Philip S, Laanbroek H J, Verstraete W. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Reviews of Environmental Science and Biotechnology*, 2002, 1: 115—141
- [ 21 ] Lu L, Han W Y, Zhang J B, et al. Nitrification of archaeal ammonia oxidizers in acid soils is supported by hydrolysis of urea. *The ISME Journal*, 2012, 6: 1978—1984
- [ 22 ] Yeager C M, Northup D E, Crow C C, et al. Changes in nitrogen-fixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil of a mixed conifer forest after wildfire. *Appl Environ Microb*, 2005, 71: 2713—2722
- [ 23 ] Nugroho R A, Röhling W F M, Laverman A M, et al. Presence of Nitrospira cluster 2 bacteria corresponds to N transformation rates in nine acid Scots pine forest soils. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 53: 473—481
- [ 24 ] Boyle-Yarwood S A, Bottomley P J, Myrold D D. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils under stands of red alder and douglas fir in Oregon. *Environ Microbiol*, 2008, 10(11): 2956—2965
- [ 25 ] Shi W, Norton J M. Microbial control of nitrate concentrations in an agricultural soil treated with dairy waste compost or ammonium fertilizer. *Soil Biol Biochem*, 2000, 32(10): 1453—1457
- [ 26 ] Fauci M F, Dick R P. Soil microbial dynamics: Short-and long-term effects of inorganic and organic nitrogen. *Soil Sci Soc Am J*, 1994, 58(3): 801—806

- [27] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, et al. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environ Microbiol*, 2008, 10(6): 1601—1611
- [28] Nicol G W, Leininger S, Schleper C, et al. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol*, 2008, 10(11): 2966—2978
- [29] Stephen J R, McCaig A E, Smith Z, et al. Molecular diversity of soil and marine 16SrRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microb*, 1996, 62: 4147—4154
- [30] Fierer N, Carney K M, Horner-Devine M C, et al. The biogeography of ammonia-oxidizing bacterial communities in soil. *Microb Ecol*, 2009, 58(2): 435—445
- [31] Malchaire S, de Boeck H J, Lemmens C M H M, et al. Diversity-function relationship of ammonia-oxidizing bacteria in soils among functional groups of grassland species under climate warming. *Appl Soil Ecol*, 2010, 44: 15—23

## GENETIC DIVERSITIES OF SOIL AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA AT VARIOUS VEGETATION ESTORATION STAGES IN SOUTHWEST GUANGXI, CHINA

Liang Yueming<sup>1,2,3</sup> Su Yirong<sup>1,3</sup> Zhang Wei<sup>1,3</sup> Chen Xiangbi<sup>1,3</sup> Liu Shujuan<sup>1,2,3</sup>  
Li Lei<sup>1,2,3</sup> Feng Shuzhen<sup>1,2,3</sup> He Xunyang<sup>1,3†</sup>

(1Key Laboratory of Subtropical Agriculture Ecology, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China)

(2University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(3Huanjiang Observation and Research Station for Karst Ecosystems, Chinese Academy of Sciences, Huanjiang, Guangxi 547100, China)

**Abstract** Soil samples were collected from soils under different vegetations, i. e. T (tussock), S (shrub), SF (secondary forest) and PF (primary forest), representing different vegetation restoration stages in the Karst region in Southwest Guangxi, China, for analysis of genetic diversity of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and their relationships with urease activity and physico-chemical properties of the soil. Results show that with the advancement in vegetation restoration, genetic diversity and Shannon and Evenness indices of AOB in the soil increased except for under tussock, and moreover, AOB community structure altered, with changes embodied in inconsistent distribution of *Nitrosospira* clusters 3a and 3b populations as a result of variation of the sensitivity of *Nitrosospira* cluster 3 population to ammonium concentration. Correlation analysis reveals that soil urease activity in the soil was positively related to ammonium content. Hence, soil urease may alter AOB diversity by affecting ammonium content. However, at the late stage of vegetation restoration, the lower ammonium content did not lead to any reduction in AOB diversity. LIBSHUFF and RDA analysis exposed that AOB community structure was closely related to vegetation type, soil urease activity and soil pH, indicating that vegetation, soil N availability and pH may possibly be the main factors affecting soil AOB diversity. These findings may serve as certain scientific basis for further understanding of soil N cycling in Karst region.

**Key words** Ammonia-oxidizing bacteria; Karst region; Urease activity; Nitrogen; Vegetation restoration

(责任编辑:卢 萍)