

红壤荒草地氨氧化细菌富集液 16S rDNA 文库的 RFLP 分析*

张丽娜^{1,3} 曹慧¹ 崔中利^{1,2†} 孙波² 李大力³ 李顺鹏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 中国科学院南京土壤研究所,南京 210008)

(3 南京理工大学化工学院,南京 210094)

摘要 分析红壤荒草地富集液中氨氧化细菌的种群组成,选取氨氧化细菌 16S rDNA 特异性引物序列,利用 PCR 技术对从富集液中抽提的细菌总 DNA 进行扩增,并建立了氨氧化细菌特异性的 16S rDNA 文库。用酶 *Hha* 和 *Rsa* 对该文库特异性片段进行了限制性酶切片断长度多态性分析 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)。随机挑选的 35 个特异性克隆片段被分成 3 个不同的 RFLP 类型,其中优势型占了所有分析克隆子的 94%,另两个型各占 3%。从每个 RFLP 类型中挑取一定的转化子进行测序,测序结果经 GenBank 检索,发现在该富集液体系文库中存在大量亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 细菌序列,由此推测红壤荒草地中存在氨氧化细菌, *Nitrosomonas* 属细菌能在富集条件下成为优势菌。

关键词 氨氧化细菌;16S rDNA 基因文库;富集液;RFLP;红壤

中图分类号 S154.34; Q938.1 **文献标识码** A

氨氧化细菌是一类专性化能自养硝化细菌,能够把氨氧化成亚硝酸盐并从中获得能量,在自然界氮素循环中起着重要作用^[1]。氨氧化细菌的分布很广,并在多数环境中被认为是影响硝化作用速率的主要因素^[2]。

土壤中氨的氧化,对土壤氮素养分的转化具有重要意义^[3]。红壤养分贫瘠,氮素含量较低,因而氮素转化对红壤地区的农业发展有着现实意义^[4~6]。由于传统的微生物培养技术的局限性,包括氨氧化细菌在内的多数土壤微生物很难获得分离培养,分子生物学能够有效避开上述弊端直接对样品进行分析^[7]。基于 16S rDNA 的序列分析表明非海洋环境中的氨氧化细菌在进化树上有着单一的起源,均来自变形菌纲^[8]。本文采用变形菌纲氨氧化细菌特异性引物扩增红壤荒草地富集液总 DNA,建立相应的氨氧化细菌特异性 16S rDNA 克隆文库,并对文库进行限制性酶切片断长度多态性分析 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP),揭示红壤地区土壤氨氧化细菌的多样性特征,以期了解红壤地区土壤氨氧化细菌的“背景值”,为比较不同土地利用方式对红壤地区氨氧化细菌群落结构的影响,以及今

后原位分析红壤中的氨氧化细菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验土样 研究区域位于江西省鹰潭市余江县。该区域具有中亚热带温暖湿润的季风气候,年均温为 17.8℃,年均降雨量为 1 785 mm,且主要集中在 4~6 月;地形为低丘岗地,海拔 35.0~54.6 m,坡度为 5°~8°;土壤为第四纪红粘土发育的红壤。

采样地为中国科学院红壤生态实验站外围荒草地,土壤样品为 5 点混合采样,采样深度为 0~20 cm。土壤采集后迅速保存于 4℃。

1.1.2 其他实验材料与试剂 *Escherichia coli* DH5 为本实验室保存;pMD 18-T Vector 购自大连宝生物公司 (TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co. Ltd)。氨苄青霉素 (Amp) 购自南京创瑞公司。TaqDNA 聚合酶,购自上海博亚生物技术公司;dNTP 购自上海生工有限公司;限制性内切酶 *Hha* I、*Rsa* I 购自大连宝生物公司;PCR 引物由上海博亚生物技术有限公

* 国家自然科学基金项目 (40371069)、中国科学院知识创新工程项目 (KZCX3-SW-427) 和中国博士后科学基金项目 (2003033495) 资助

† 通讯作者, E-mail: czl@njau.edu.cn

作者简介:张丽娜 (1981~),女,硕士研究生,主要从事土壤微生物分子生态学研

收稿日期:2006-05-26;收到修改稿日期:2006-03-08

司合成;DNA凝胶回收试剂盒购自上海博亚生物技术有限公司。

氨氧化细菌富集培养液配方参考文献[9]。

核酸琼脂糖电泳缓冲液:1×TAE缓冲液。

8%聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)配方:每100 ml含30%聚丙烯酰胺26.6 ml, ddH₂O 52.7 ml, 5×TBE (Tri-硼酸 0.045 mol L⁻¹、EDTA 0.001 mol L⁻¹) 20 ml, 10%过硫酸铵 0.7 ml, TEMED (N,N,N,N-四甲基乙二胺) 65 μl。

核酸PAGE胶电泳缓冲液:0.5×TBE缓冲液。

PAGE电泳染色液:0.5 g AgNO₃用 ddH₂O定容至500 ml。

PAGE电泳显色液:10 g NaOH, 0.2 g Na₂CO₃加2 ml甲醛以 ddH₂O定容至500 ml。

1.2 方法

1.2.1 菌体富集 称取5 g土样加到100 ml灭菌富集培养液中,摇床上200 r min⁻¹摇30 min充分分散,置于28℃培养箱中避光生长,每隔几天用格里斯试剂在白色瓷板上检验NO₂⁻的生成情况。从显色较强的富集培养液中取5 ml接入新鲜培养液中,继续培养并进行上述测试,经过几次重复操作,不断淘汰其他异养菌。

1.2.2 富集液总DNA提取与检验 将格里斯试剂检测为阳性的100 ml富集培养液倒入灭菌离心瓶中,室温下10 000 g离心10 min沉淀,倾去上清,提取方法参考Zhou的直接法^[10]。用0.75%的琼脂糖凝胶电泳检查提取质量和片段大小,用紫外分光光度法对总DNA进行定量。

1.2.3 氨氧化细菌特异性16S rDNA片段的扩增、克隆及克隆文库的构建 (1) PCR扩增。用直接法提取的红壤荒地富集液总DNA片段可不经纯化直接用于PCR扩增。

氨氧化细菌功能基因 *amaA* 扩增引物对^[11]: *amaA*-1F 5'-GGGGTTCTACTGGTGGF-3' 和 *amaA*-2R 5'-CCCCTCKGSAAGCCTTC TIC-3' [K=G or T; S=G or C]。氨氧化细菌特异性16S rDNA的引物:Eub338 5'-ACTCCTACGGGAGCGC-3'^[12]和 Nso1225 5'-CGCCATTGT ATTACGTCCGA-3'^[13]。

AmaA PCR扩增反应体系:10×缓冲液2.5 μl, Mg²⁺ (25 mmol L⁻¹) 2.5 μl,引物(25 mmol L⁻¹)各0.3 μl, dNTP(25 mmol L⁻¹) 2 μl,适当稀释的DNA模板1.0 μl, *Taq* DNA聚合酶1.0 U, ddH₂O补充至总体积25 μl。*AmaA* PCR热循环参数:94℃预变性5 min, 94℃变性15 s, 55℃复性20 s, 72℃延伸40 s,

扩增30个循环;72℃延伸10 min。

氨氧化细菌16S rDNA片段PCR扩增反应体系:10×缓冲液2.5 μl, Mg²⁺ (25 mmol L⁻¹) 2.5 μl,引物(25 mmol L⁻¹)各0.3 μl, dNTP(25 mmol L⁻¹) 2 μl,适当稀释的DNA模板1.0 μl, *Taq* DNA聚合酶1.0 U, ddH₂O补充至总体积25 μl。氨氧化细菌PCR热循环参数:94℃预变性4 min, 94℃变性40 s, 57.5℃复性30 s, 72℃延伸40 s,扩增30个循环;72℃延伸10 min。

PCR扩增产物均采用0.75%琼脂糖凝胶电泳检验。

(2) PCR产物的T/A克隆及克隆文库的构建。扩增4管氨氧化细菌特异性16S rDNA片段,均匀混合以消除单次扩增的偏向性。合并扩增产物并通过0.75%的琼脂糖凝胶电泳回收。纯化回收的约900bp氨氧化细菌特异性16S rDNA扩增片段与pMD 18-T Vector (TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co. Ltd)按2:1的摩尔比混合,在T4连接酶作用下,16℃过夜。酶连体系为:pMD 18-T Vector (TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co. Ltd) 1 μl, PCR产物4 μl,酶连缓冲液(含T4 DNA连接酶)5 μl,总体积10 μl。DH5感受态细胞制备与酶连产物的转化参照文献^[14]进行,通过蓝白斑筛选挑取阳性克隆子,建立氨氧化细菌特异性16S rDNA克隆文库。

直接将克隆细胞作为PCR扩增的模板,依然采用上述氨氧化细菌特异性16S rDNA引物对进行PCR扩增。扩增反应体系中加入2 μl 20%的吐温20裂解细胞,PCR体系仍然为25 μl。PCR复性温度提高至58℃,热循环参数同上。扩增产物用0.75%琼脂糖凝胶电泳检验。

1.2.4 克隆文库的RFLP分析 *Hha*I酶切体系:扩增产物4.5 μl,限制性内切酶*Hha*I 3U, 10×缓冲液数量μl,灭菌ddH₂O补充至10 μl。37℃消化4 h。

*Rsa*I酶切体系:扩增产物3.5 μl,限制性内切酶*Rsa*I 3U, 10×缓冲液1 μl, BSA 1 μl,灭菌ddH₂O补充至10 μl。37℃消化4 h。

酶切DNA片段用8%PAGE胶在250V直流电压下电泳3 h分离,银染显色。所得DNA带型图谱扫描保存,人工对酶切带型进行比较分析。

1.2.5 核酸序列分析 根据酶切带型的不同将转化子分成不同的RFLP类型,每个RFLP类型中选取一定量的克隆子进行测序。测序工作委托上海博亚公司完成。应用Bioedit软件将测序公司返回原

序列进行编辑,非嵌合体序列在 GenBank 数据库中进行比对分析,寻找亲缘关系最近的菌体或者克隆。

2 结果

2.1 氨氧化细菌的检验

经过约 2 周的静置富集培养,培养液上清呈现淡红色。以未接种的培养液作为对照,采用格里斯试剂在白瓷板上可检验到富集培养液中有 NO_2^- 生成,表明富集液中发生了亚硝化反应,即存在氨氧化细菌即亚硝化菌。

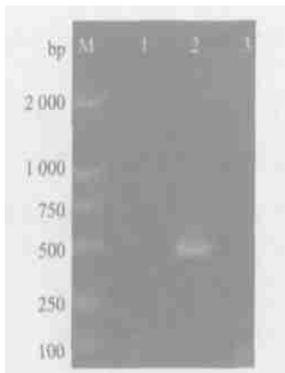


图 1 *amaA* 基因扩增电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *amaA* gene amplification (M. DL 2 000 Marker; 1. Negative amplification; 2. Amplification from enrichment culture total DNA; 3. From total DNA of *E. coli*)

以直接法提取的富集培养液总 DNA 作为模板,用 PCR 扩增氨氧化细菌功能基因 *amaA*, 0.75% 琼脂糖电泳得到约 490bp 的 DNA 片断(图 1),不包含 DNA 模板的对照以及大肠杆菌总 DNA 均无扩增片段,证实土壤富集培养液中存在氨氧化细菌。

2.2 氨氧化细菌特异性 16S rDNA 片段的 PCR 扩增

图 2 为从土壤荒草地中提取得到的总 DNA,以此为模板,氨氧化细菌特异性 16S rDNA 引物对扩增得

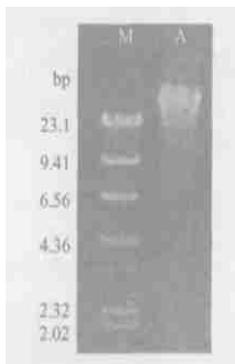


图 2 富集液总 DNA 电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of total DNA from enrichment culture (M DNA/ *Hind* marker)

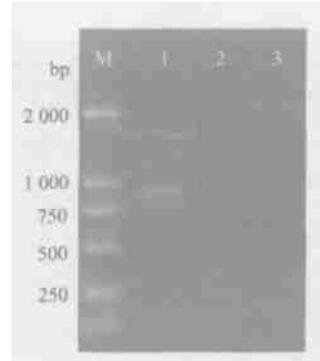


图 3 氨氧化细菌特异性 16S rDNA 扩增电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of AOB-specific 16S rDNA (M. DL 2 000 marker; 1. Amplification from enrichment culture total DNA; 2. With on template; 3. From total DNA of *E. coli*)

到约 900bp DNA 片断(图 3),无其他长度的条带,不加 DNA 模板的对照以及大肠杆菌总 DNA 均无扩增。

2.3 富集液文库的 RFLP 分析

建立的红壤荒草地氨氧化细菌富集液文库包含 300 个克隆子,随机挑取其中的 60 个克隆子用氨氧化细菌特异性 16S rDNA 引物重新进行扩增,其中 35 个克隆子 PCR 扩增得到的片段长度正确,有效扩增率为 58.3%。

Hha I 与 *Rsa* I 皆为 4 碱基限制性内切酶,而且 *Hha* I 的酶切位点是 GCGC, *Rsa* I 的酶切位点是 GTAC,两种酶的酶切位点包括了 GC 和 AT 位点。预先从 GenBank 中下载 变形菌纲内氨氧化细菌的 16S rDNA 序列,在 BioEdit 中用 *Hha* I 与 *Rsa* I 两种限制性内切酶分别进行电子酶切,酶切结果显示这两种酶对 变形菌纲内氨氧化细菌有较好的区分作用,能够在属及属以下水平上进行鉴别(数据未给出)。

随机挑选克隆子,重新将克隆子内质粒中的插入片段扩增出来。正确长度的插入片段经限制性内切酶 *Hha* I 和 *Rsa* I 分别酶切及电泳分离,忽略产生的细小杂带,记录主要的酶切带型(图 4,图 5)。*Hha* I 产生 3 种类型,每种类型所占比例分别为:94%、3%和 3%;*Rsa* I 也产生 3 种类型,对应比例同样为 94%、3%和 3%。这两种酶对本库的分辨能力相同,*Hha* I 产生的酶切图谱条带相较而言更为清晰。综合起来,两种限制性内切酶一共产生了 3 种 RFLP 类型。

克隆文库的库容理论上代表样品中微生物的种类的多样性。理论上,当 Coverage C 为 100% 时可以代表样品中的所有微生物的种类,当库容含量越高说明库的覆盖率越高。

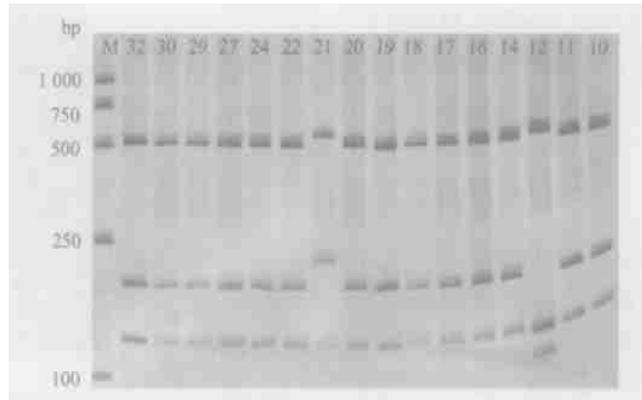


图4 不同克隆子的 Hha I 酶切图谱

Fig. 4 Hha I cleavage maps of different clones (M. DL 2 000 marker)

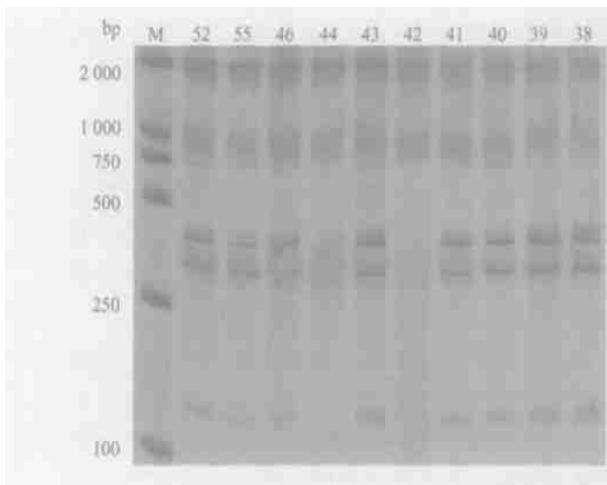


图5 不同克隆子的 Rsa I 酶切图谱

Fig. 5 Rsa I cleavage maps of different clones (M. DL 2 000 marker)

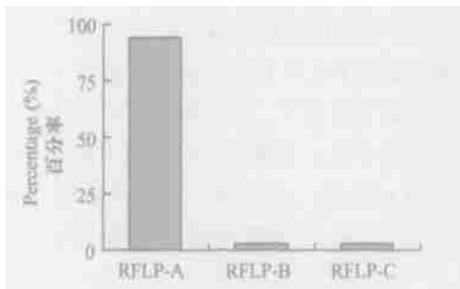


图6 两种酶切产生的 RFLP 类型及所占比例

Fig. 6 RFLP types and their proportions

富集液文库分别经 *Rsa* I 和 *Hha* I 酶切分型产生 RFLP 类型分布情况见图 6 和表 1。

表 1 克隆文库 Hha - Rsa 酶酶切类型的多样性

Table 1 Diversity of cloned library digested by enzymes Hha I and Rsa I

限制性内切酶	RFLP 类型	库容值
Restriction endonuclease	RFLP types	Coverage C (%)
<i>Hha</i> I	3	94.1
<i>Rsa</i> I	3	94.1
<i>Hha</i> I 和 <i>Rsa</i> I	3	94.1

2.4 氨氧化细菌 16S rDNA 测序与系统发育

从最主要的 RFLP 类型 (RFLP-A) 中随机挑选 5 个克隆子 (F3、F8、F14、F20 和 F27), 与另外两个 RFLP 类型 (RFLP-B 和 RFLP-C) 包含的克隆子 (F12 与 F21) 一起进行测序。将测序结果在 NCBI 中登录, 登录号列于表 2。

测序所得 16S rDNA 序列用 BioEdit 软件进行两两比较序列同源性, 克隆子插入片段之间的序列同源性列于表 3。从表中可知, 测序的 7 个克隆子插入片段之间的序列同源性范围从 86% 到 99%。其中 F3、F8、F14、F20 和 F27 之间具有较高的序列相似性 (99%), F12、F21 与其他插入片段的相似性均低于 97%, 可以推测前 5 个克隆子所包含的插入片段来自相同或相近属中的菌株, 而后两者分别来自不同的属^[15]。

表 2 克隆子 16S rDNA 序列 NCBI 登录号

Table 2 Accession numbers of the cloned 16S rDNA sequences

克隆子 Clones	F3	F8	F12	F14	F20	F21	F27
登录号 Accession numbers	DQ060413	DQ060412	DQ060407	DQ060409	DQ060411	DQ060408	DQ060410

表 3 测序 16S rDNA 片段的相似性矩阵

Table 3 Similarity matrix of sequenced 16S rDNA

克隆子 Clones	F3	F8	F12	F14	F20	F21	F27
F3	100 %						
F8	99 %	100 %					
F12	88 %	86 %	100 %				
F14	99 %	99 %	89 %	100 %			
F20	99 %	99 %	88 %	99 %	100 %		
F21	88 %	87 %	86 %	90 %	88 %	100 %	
F27	99 %	99 %	89 %	99 %	99 %	90 %	100 %

测序所得序列用 blast 软件与 GenBank 数据库中的 16S rDNA 序列进行同源性比较。利用 ClustalX 软件包中程序生成与测序序列所在菌相近类群的系统发育进化树。图 7 显示,主要的 RFLP 类型与亚

硝化单胞菌属 *Nitrosomonas communis* 的序列同源性在 98 % 以上,可以将其归为亚硝化单胞菌属。另外两种菌与未鉴定的 γ -proteobacterium (97 %) 和 *Methylovorus mays* (96 %) 有较高的序列同源性。

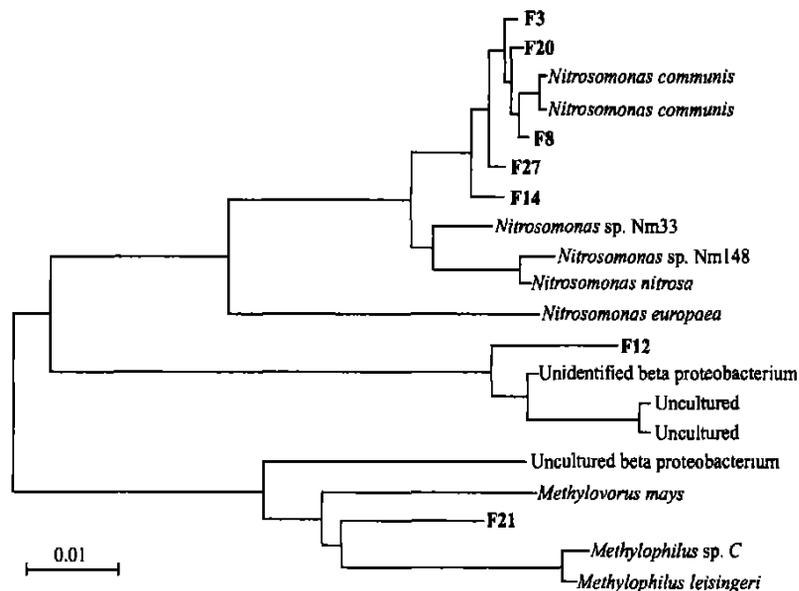


图 7 红壤荒草地氨氧化细菌富集液菌的系统发育地位

Fig. 7 Phylogenetic position of the bacteria from enrichment culture of Red soil

3 讨论

红壤为一种酸性土壤,氮在其中主要以铵离子 NH_4^+ 的形式存在,由于氨氧化细菌进行亚硝化作用所需要的底物—— NH_3 在较低 pH 的酸性土壤中存在较少,这会使得红壤中相应的氨氧化作用弱很多^[16]。通过对富集液的分子生物学研究,可以证明红壤荒草地中仍有氨氧化细菌存在。

Nso1225 常被用作探针对 变形菌纲中的氨氧

化细菌进行检测^[17]。通过对 PCR 扩增建库后产生的 3 个 RFLP 类型进行 BLAST 比对分析,发现有 2 个 RFLP 类型共计 2 个克隆子与氨氧化细菌亲缘关系较远(最低仅为 86%)。排除 PCR 偏失的影响,Nso1225 对氨氧化细菌的特异性并非百分之百。

本文中采用的氨氧化细菌富集培养液 pH 为 7.2。16S rDNA 序列比对的结果显示,红壤荒草地富集液中氨氧化细菌的种类较为单一,主要是一类与 *Nitrosomonas communis* 序列同源性较高的氨氧化细菌(序列同源性在 98 % 以上)。弱碱性富集液中

得到的主要是亚硝化单胞菌属序列,说明红壤中存在的亚硝化单胞菌能在弱碱性条件中形成优势菌。

参考文献

- [1] Teske A, Alm E, Regan J, *et al.* Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bacteriol.*, 1994, 176: 6 623 ~ 6 630
- [2] Hans-Peter H, Adrian B, Christopher B, *et al.* Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004, 101: 15 136 ~ 15 141
- [3] 孙波, 张桃林, 赵其国. 我国中亚热带缓丘区红粘土红壤肥力的演化. 化学和生物学肥力的演化. *土壤学报*, 1999, 36(2): 203 ~ 217. Sun B, Zhang TL, Zhao Q G. Fertility evolution of red soil derived from quaternary red clay in low-hilly region in middle subtropics. Evolution of soil chemical and biological fertilities (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 1999, 36(2): 203 ~ 217
- [4] 林江辉, 李辉信, 胡锋, 等. 干土效应对土壤生物组成及矿化与硝化作用的影响. *土壤学报*, 2004, 41(6): 924 ~ 930. Lin J H, Li H X, Hu F, *et al.* Effects of rewetting on soil biota structure and nitrogen mineralization, nitrification in air-dried red soil (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(6): 924 ~ 930
- [5] 王连峰, 蔡祖聪. 水分和温度对旱地红壤硝化活力和反硝化活力的影响. *土壤*, 2004, 36(5): 543 ~ 546. Wang L F, Cai Z C. Effects of temperature and water regime on nitrification and denitrification activity of upland red soils (In Chinese). *Soils*, 2004, 36(5): 543 ~ 546
- [6] Sun G, Wu N, Luo P. Soil N pools and transformation rates under different land uses in a subalpine forest-grassland ecotone. *Pedosphere*, 2005, 15(1): 52 ~ 58
- [7] Matulewich V A, Strom P F, Finstein M S. Length of incubation for enumerating nitrifying bacteria present in various environments. *Appl. Microbiol.*, 1975, 29: 256 ~ 268
- [8] 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: 1 147 ~ 1 153
- [9] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986. 2. Xu G H, Zheng H Y. Handbook of Soil Microbial Analysis Method (In Chinese). Beijing: Chinese Agricultural Press, 1986. 2
- [10] Zhou J Z, Mary A B, James M T. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316 ~ 322
- [11] McTavish H, Fuchs J A, Hooper A B. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.*, 1993, 175: 2 436 ~ 2 444
- [12] Amann R I, Krumholz L, Stahl I D A. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*, 1990, 172: 762 ~ 770
- [13] Mobarry B K, Wagner M, Urbain V, *et al.* Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62: 2 156 ~ 2 162
- [14] Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 1990, 96(1): 23 ~ 28
- [15] Borneman J, Triplett E W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63(7): 2 647 ~ 2 653
- [16] George A K, John R S. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001, 55: 485 ~ 529
- [17] Calvó L, Vila X, Abell C A, *et al.* Use of the ammonia-oxidizing bacterial-specific phylogenetic probe Nso1225 as a primer for fingerprint analysis of ammonia-oxidizer communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, 63: 715 ~ 721

RFLP ANALYSIS OF AOB-SPECIFIC 16S rDNA LIBRARY FROM RED SOIL ENRICHMENT CULTURE

Zhang Lina^{1,3} Cao Hui¹ Cui Zhongli^{1,2†} Sun Bo² Li Dali³ Li Shunpeng¹

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

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

(3 College of Chemical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

Abstract Chemolitho-autotrophic ammonia-oxidizing bacteria are responsible for the rate-limiting step of nitrification in a wide variety of environments, making them important in the global cycling of nitrogen. In order to analyze the ammonia-oxidizing bacteria population structure in red soil enrichment culture, a pair of AOB-specific primers was designed, and total microbial genomic DNA of enrichment culture was extracted by the direct method of PCR-amplification template. An AOB-specific 16S rDNA clone library was subsequently constructed. RFLP analysis of 16S rDNA was conducted using enzymes (*Hha* and *Rsa*) to digest 16S rDNA from the library. The randomly selected 35 cloned fragments were finally clustered into 3 different phlotypes, with the most abundant phylotype accounting for 94% of the selected 16S rDNA clones and the other two phlotypes for 3%, respectively. Seven clones from 3 phenotypes were sequenced and the 16S rDNA sequences were compared with those from GenBank. Based on the Blast analysis, a lot of *Nitrosomonas*-like sequences were found in this library. The result shows that there are ammonia-oxidizing bacteria in the red soil and *Nitrosomonas* sp. is a dominant bacterium in enrichment condition.

Key words Ammonia-oxidizing bacteria; 16S rDNA clom library; Enrichment culture; RFLP; Red soil