

# 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\*

钟文辉<sup>1,2</sup> 蔡祖聪<sup>1†</sup> 尹力初<sup>3</sup> 张鹤<sup>4</sup>

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

(2 南京师范大学化学与环境科学学院, 南京 210097)

(3 湖南农业大学资源环境学院, 长沙 410128)

(4 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

**摘要** 以中国科学院红壤生态试验站发育于第四纪红黏土的植稻红壤为研究对象,研究了长期种植水稻和施用无机肥对土壤  $\gamma$ -变形杆菌纲中氨氧化细菌多样性和硝化作用的影响。原始红壤改种水稻 13 年后,氨氧化细菌 16S rDNA 的 DGGE 条带数量增加,条带谱与原始红壤的差异较大,相似性为 61%,说明种植水稻后土壤氨氧化细菌群落结构发生了变化。PCR-DGGE 方法研究结果也显示,长期施用无机氮肥的处理(NP、NPK 和 NK),DGGE 带谱相似性较高,达到 73%,硝化率和硝化势均高于未施用氮肥的处理。逐步回归分析显示硝化率和硝化势均随着土壤脲酶活性的提高而显著增加。推测尿素可提高土壤水解氮含量,使土壤脲酶活性提高,促进硝化细菌的生长,进而提高硝化率和硝化势。

**关键词** 植稻红壤;氨氧化细菌;多样性;PCR-DGGE;硝化率;硝化势

**中图分类号** S154

**文献标识码** A

红壤广泛分布于中国南部和中部的热带和亚热带地区,为高度风化和淋溶的地带性土壤,pH 低、营养缺乏,特别是缺磷和氮<sup>[1]</sup>。生长在红壤中的作物通常受高酸度和贫营养供给的限制。

分子生物学方法如 PCR-DGGE 能够在分子水平上对土壤微生物多样性进行研究<sup>[2,3]</sup>。PCR-DGGE 自 1993 年被引入微生物生态学研究以来,被广泛用作分子工具来比较土壤微生物种群的多样性和对种群动态的监测<sup>[4]</sup>。氨氧化细菌是一群能够将氨氧化为亚硝酸盐的微生物,在分类上主要包括  $\gamma$ -变形杆菌纲中的亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)和亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)以及  $\gamma$ -变形杆菌纲中的亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)。目前已根据  $\gamma$ -变形杆菌纲中的氨氧化细菌 16S rDNA 的碱基序列设计出特异性扩增该氨氧化细菌 16S rDNA 的引物<sup>[5]</sup>,使得采用 PCR-DGGE 手段研究这些氨氧化细菌多样性成为可能。

土壤硝化与反硝化作用是氮素生物地球化学循环的重要环节之一。硝化作用受土壤温度、水分含

量、质地、pH、有机质含量、含氮量和微生物生物量及其活性等诸多因子的影响<sup>[6~8]</sup>。过去通常认为,土壤硝化作用对 pH 很敏感,较低的土壤 pH 将不利于硝化作用的进行<sup>[9]</sup>。已发现在酸性土壤中存在适应酸性土壤条件的硝化菌菌株,现在认为硝化作用可在 pH4~5 条件下发生<sup>[10]</sup>。目前国内外对红壤硝化作用及其影响因素作了一些研究,但报道的研究结果尚有不一致之处<sup>[6,11~13]</sup>。

本研究选用长期施用无机肥定位试验红壤样品作研究对象,采用 PCR-DGGE 技术研究红壤长期种植水稻后和施用无机肥对  $\gamma$ -变形杆菌纲中的氨氧化细菌多样性的影响,探讨红壤改种水稻后,氨氧化细菌多样性和硝化作用变化的可能机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计与样品采集

长期无机肥定位试验始于 1990 年,设置于中国科

\* 国家自然科学基金项目(40471065)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-408)及土壤与农业可持续发展国家重点实验室基金项目(055122)联合资助

† 通讯作者, E-mail: zccai@issas.ac.cn

作者简介:钟文辉(1965~),男,博士,教授,主要从事环境微生物及环境生物技术研究。E-mail: zhongwenhui@njnu.edu.cn

收稿日期:2006-10-09;收到修改稿日期:2007-12-26

学院鹰潭红壤生态试验站 (28°15'30"N, 116°35'30"E)。该地区具有典型的亚热带季风气候, 年降雨量 1 795 mm, 年蒸发量 1 318 mm, 年平均气温 17.6℃。长期试验土壤取自发育于第四纪红黏土的未耕作荒地。试验的作物系统为双季稻, 冬季休耕。设置 5 个处理, 分别为对照 CK (不施肥)、NK (施用 N、K 肥)、NP (施用 N、P 肥)、PK (施用 P、K 肥) 和 NPK (施用 N、P、K 肥), 每个处理设 4 个重复。施用的 N、P 和 K 肥分别为尿素、过磷酸钙和氯化钾, 年施用量分别为: 尿素 250 kg hm<sup>-2</sup> 作基肥, 83 kg hm<sup>-2</sup> 作追肥, 过磷酸钙 273 kg hm<sup>-2</sup>, 氯化钾 124 kg hm<sup>-2</sup> 作基肥施用。水稻籽粒和秸秆均收获, 不施用有机肥料。但冬季休闲期间生

长的杂草在早稻移栽前耕翻入土壤。

土壤样品于 2003 年 3 月采集于耕作层 (0~20 cm)。原始对照土壤样品 (CK') 采集于临近的未开垦荒地, 该荒地作为长期试验的取土点。采样后剔除可见的根系, 过 2 mm 筛, 4℃ 保存。所有分析在两个月内完成。

### 1.2 土壤化学成分测定方法

土壤有效磷、速效钾分别采用 Bray 1 法 (HCl + NH<sub>4</sub>F 法)、四苯硼钠比浊法测定<sup>[14]</sup>; 微生物生物量碳 (C<sub>mic</sub>) 和微生物生物量氮 (N<sub>mic</sub>) 用氯仿熏蒸浸提法提取<sup>[14]</sup>。土壤全碳、全氮采用碳氮自动分析仪测定。结果见表 1。

表 1 长期试验土壤的一些化学特性

Table 1 Some chemical properties of the soils of the long-term experiment

处理 Treatment	pH (H <sub>2</sub> O)	总含量 Total content				有效营养 Available nutrient			微生物生物量 Microbial biomass	
		C <sub>org</sub>	N	P	K	N	P	K	C <sub>mic</sub>	N <sub>mic</sub>
		(g kg <sup>-1</sup> )				(mg kg <sup>-1</sup> )				
CK'	5.03	2.64	0.50	0.23	10.7	26.2	0.15	32.5	29.7	5.60
CK	5.77a	5.60a	0.76a	0.28a	11.3a	49.2a	0.17a	116b	55.1a	21.2a
NK	5.55b	6.47a	0.95b	0.24a	11.1a	56.2a	0.26a	154c	143a	23.4a
NP	5.41b	8.23b	1.09bc	0.68bc	10.9a	69.3bc	4.56b	66.0a	254c	35.8bc
PK	5.51b	7.76b	1.03bc	0.73c	11.0a	64.1b	7.26c	126bc	175b	31.7b
NPK	5.38b	8.87b	1.10c	0.67bc	11.0a	73.5c	3.80b	105b	263c	45.3c

注: 表中的值为 4 个重复的平均值, CK' 处理除外 (其未做重复)。同一列中不同的字母代表差异显著 ( $p < 0.05$ )。C<sub>org</sub>、C<sub>mic</sub> 和 N<sub>mic</sub> 代表有机碳、微生物量生物碳和微生物生物量氮。Note: The values in the table are means of four replicates except treatment CK', which was not duplicated. Different letters in the same column represent significance of difference at  $p < 0.05$ . C<sub>org</sub>, C<sub>mic</sub> and N<sub>mic</sub> represent soil organic carbon, microbial biomass C and N, respectively.

### 1.3 土壤 DNA 提取与 rDNA 的 PCR 扩增

采用 FastDNA<sup>R</sup> SPIN Kit for Soil 试剂盒和 Fast Prep<sup>TM</sup> FP120 核酸提取仪提取土壤 DNA。使用嵌套式 PCR 扩增技术 (nested PCR technique) 扩增土壤中 - 变形杆菌纲氨氧化细菌 16S rDNA, PCR 引物和扩增条件列于表 2。PCR 反应体系的组成: 上、下游引物各 0.2

μmol L<sup>-1</sup>, dNTP 200 μmol L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol L<sup>-1</sup>, 1 × Taq DNA 聚合酶缓冲液 (不含 Mg<sup>2+</sup>), 每 50 μl 反应体系用 TaqDNA 聚合酶 1.25 U。在第一轮 PCR 中每 25 μl 反应体系加入 DNA 提取物 1 μl, 在第二轮 PCR 中每 50 μl 反应体系加入第一轮扩增产物 1 μl。用 1.5% 琼脂糖凝胶检测 PCR 扩增片段。

表 2 本研究中使用的 PCR 条件

Table 2 Conditions for PCR amplification used in this study

靶 Target	引物 Primers	PCR 条件 PCR condition				参考文献 Reference		
		循环次数 Number of cycles	变性 Denaturation ( ) (min)	退火 Annealing ( ) (min)	链延伸 Elongation ( ) (min)			
第一轮 PCR First PCR round	CTO189fAB, CTO189fC, CTO653r	35	94	1	57	72	2	[5]
第二轮 PCR Second PCR round	P338fGC, P518r	30	95	1	53	72	2	[15]

#### 1.4 DGGE

DGGE 采用文献 [3] 的方法,聚丙烯酰胺凝胶浓度 8% (w/v),变性剂梯度范围为 35% ~ 65%,电泳缓冲液为 0.5 ×TAE,使用 Bio-Rad D Gene 系统 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 于 60、200 V 电泳 5 h。用 1 ×10<sup>4</sup> SYBR Gold 染胶 30 min。染色后立即成像和拍照。

#### 1.5 DGGE 图谱分析、DGGE 带的回收与测序

DGGE 条带数量统计及 DGGE 带谱聚类分析使用专业软件 (Imaging and Analysis Software)。DGGE 带谱主成分分析使用 SPSS10.0。采用文献 [16] 的方法从聚丙烯酰胺凝胶中回收 DGGE 带,由上海博亚生物技术有限责任公司测定其序列。

#### 1.6 土壤硝化强度测定

分别采用文献 [11]、[14] 的方法测定硝化率和硝化势。称 20 g 土壤样品于三角瓶,按 65% 田间持水量加水后,瓶口盖上塑料薄膜以保持土壤水分,置于 25℃ 培养箱中培育 21 d。土壤样品经培养后用 2 mol L<sup>-1</sup> KCl 浸提,提取液中硝态氮和铵态氮用德国产氮分析仪 (型号 SKALAR) 测定。土壤硝化率为土壤加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (N 250 mg kg<sup>-1</sup>) 培育后,硝态氮量与矿质氮总量之比,即: (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-N / [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N +

(NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-N] ×100。土壤硝化势为单位培养时间内所形成的硝态氮量,即: [培养后 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-N - 培养前 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-N] / 培养时间。

#### 1.7 土壤脲酶活性测定

利用脲酶水解尿素时生成的氨与苯酚钠及次氯酸钠反应形成蓝色靛酚,用比色法测得生成氨的量,以 1 kg 土壤 24 h 产生的氨量 (mg) 表示脲酶的活性 [14]。

#### 1.8 统计分析

使用 SPSS10.0 进行方差分析和回归分析。逐步回归分析掌握的尺度:  $p < 0.05$  采用,  $p > 0.1$  除去。

## 2 结果与分析

### 2.1 氨氧化细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 及序列

氨氧化细菌 16S rDNA PCR 扩增结果见图 1,第一轮和第二轮扩增分别得到 465 bp 和 237 bp 的 16S rDNA 片段。从第一轮扩增得到的 PCR 产物量看,施用氮肥的各处理 NK、NP、NPK 的扩增产物量明显较不施用氮肥的各处理 CK、PK 的高,CK 的产物量最低 (表 3)。

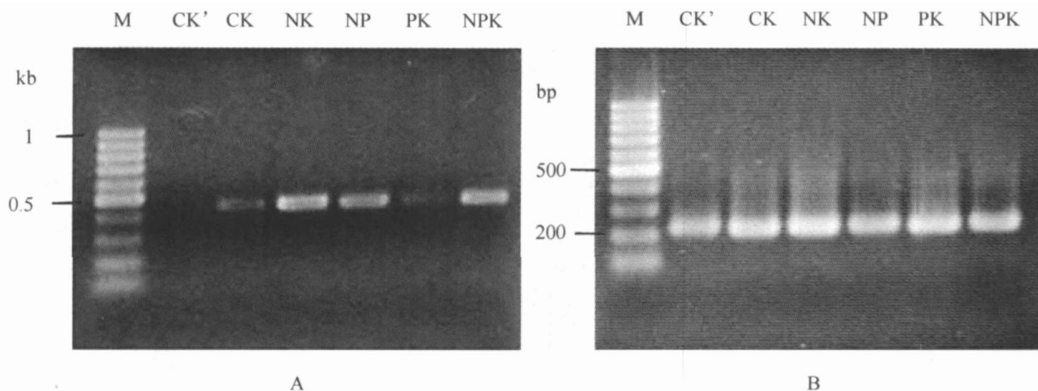


图 1 土壤样品中氨氧化细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification products of ammonium oxidisers 16S rDNA in soil samples

注: M: DNA Marker (100 bp ladder); A 和 B 分别为第一、二轮 PCR 扩增产物 Note: M: DNA marker (100 bp ladder); A and B are first and second round PCR amplification product

表 3 氨氧化细菌 16S rDNA 的第一轮 PCR 扩增产物量

Table 3 First round PCR yield for 16S rDNA of ammonium oxidisers

处理 Treatment	CK'	CK	NK	NP	PK	NPK
PCR 产物量						
Yield of PCR products (int ×mm)	4.6	27.5	104.7	75.3	16.8	107.6

第二轮扩增产物的 DGGE 图谱见图 2。CK'、CK、NK、NP、PK、NPK 分别有 11、14、12、13、15 和 12 条 DNA 带 (图 2A, 表 4)。原始红壤改种水稻后,有 1 条 DGGE 带消失 (图 2 中 A6),但增加了 7 条 DGGE 带 (图 2A 中 B1, B3, B4, B5, B6, B7, B9)。聚类分析 (图 3) 表明, NP 和 NPK 的相似性最高, 3 个施 N

的处理(NP、NPK 和 NK) 的 DGGE 带谱相似性达到 73%~80%;CK' 与其他处理的差异最大, DGGE 带谱相似性只有 61%。DGGE 带谱主成分分析显示, 第一、二、三主成分的方差贡献率分别为 41.38%、

20.44%和 18.19%, 前三个主成分的方差贡献率达 80.02%。三维因子载荷图(图 2B) 显示, CK' 分布在第 1 因子的负端, 得分最低, 其他处理分布在第 1 因子的正端且得分接近。另一方面, CK 和 PK 分布在

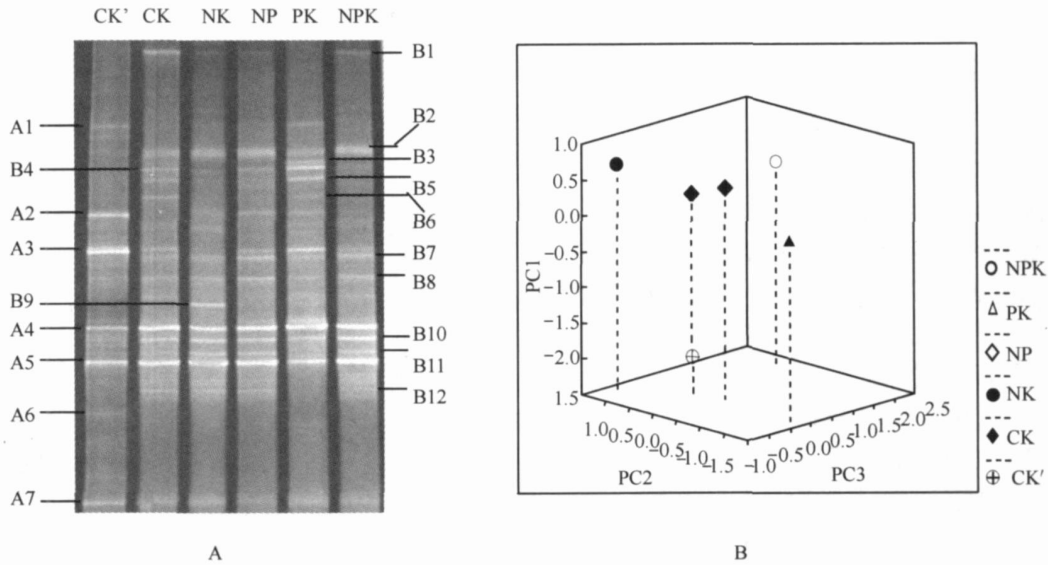


图 2 土壤样品中氨氧化细菌 16S rDNA 的 DGGE 图谱(A) 及其主成分分析结果(B)

Fig. 2 DGGE pattern (A) and its PCA analysis (B) of ammonium oxidisers 16S rDNA in soil samples.

注: PCA: 主成分分析 Note: PCA: Principal Component Analysis

表 4 DGGE 带的确认及根据测序结果推测的 DGGE 带代表的氨氧化细菌

Table 4 Identification of DGGE bands and deduced ammonium oxidizers that DGGE band represented based on DNA sequencing

序号 Order	CK'	CK	NK	NP	PK	NPK	DGGE 带代表的氨氧化细菌	
							The ammonium oxidizers that DGGE band represented	
							菌株或克隆 Strain or clone	同一性 Identity
A1	√				√		<i>Nitrosospora</i> sp.	91 %
A2	√			√	√		<i>Nitrosomonas</i> sp.	98 %
A3	√	√		√	√	√	<i>Nitrosospora</i> sp. clone GCPF38	95 %
A4	√	√	√	√	√	√	-proteobacterium clone KMC	99 %
A5	√	√	√	√	√	√	<i>Nitrosospora</i> sp. clone BMCPn6	100 %
A6	√						<i>Nitrosospora</i> sp.	96 %
A7	√	√	√	√	√	√	<i>Nitrosospora</i> sp.	88 %
B1		√	√	√		√	<i>Nitrosospora</i> sp.	100 %
B2	√	√	√	√	√	√	<i>Nitrosospora</i> sp. clone ORC7b	100 %
B3					√		<i>Nitrosomonas</i> sp.	99 %
B4		√	√	√	√	√	<i>Nitrosospora</i> sp.	100 %
B5		√			√		<i>Nitrosomonas</i> sp.	
B6		√			√		<i>Nitrosospora</i> sp. clone BMSPd7	100 %
B7		√	√	√	√	√	<i>Nitrosospora</i> sp.	100 %
B8	√	√	√	√	√	√	<i>Nitrosospora</i> sp.	100 %
B9			√				<i>Nitrosospora</i> sp.	100 %
B10	√	√	√	√	√	√	<i>Nitrosospora</i> sp. clone BMSPd7	99 %
B11	√	√	√	√	√	√	<i>Nitrosospora</i> sp. clone F9	100 %
B12		√	√	√		√	<i>Nitrosospora</i> sp.	100 %

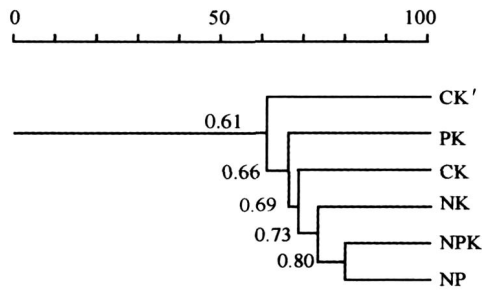


图3 土壤样品氨氧化细菌 16S rDNA DGGE 带谱的聚类分析结果

Fig. 3 Clustering analysis of the DGGE patterns of ammonium oxidizers 16S rDNA in the soil samples

第 2 因子的负端,其他分布在第 2 因子的正端。经 DNA 序列测定和 GenBank BLAST 联网检索显示(表 4),DGGE 带所代表的氨氧化细菌 16 种是亚硝化螺菌(*Nitrosospira* sp.), 3 种是亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas* sp.)。原始红壤改种水稻后,有 1 种亚硝化单胞菌消失,但增加 7 种亚硝化螺菌和 1 种亚硝化单胞菌(图 2,表 4)。

## 2.2 硝化作用和脲酶活性

培育 3 周后,测得的土壤硝化率和硝化势均较低。同一处理的硝化率,硝化势和脲酶活性均有一定的差异,但施用氮肥的处理(NK、NP、NPK)均高于未施用氮肥的处理(CK 和 PK)及荒地红壤(CK') (表 5)。相关分析显示,硝化率和硝化势均与土壤有机碳( $C_{org}$ )、总氮(TN)、水解氮(HN)、 $C_{mic}$ 、 $N_{mic}$ 和脲酶活性呈显著或极显著相关关系(表 6),逐步回归分析进一步显示,硝化率和硝化势均随着土壤脲酶

表 5 长期试验土壤硝化率、硝化势和脲酶活性

Table 5 Nitrification rate, nitrification potential and urease activity of the soil in the long-term experiment

处理 Treatment	硝化率 Nitrate rate (%)	硝化势 Nitrifi- cation potential ( $mg\ kg^{-1}\ d^{-1}$ )	脲酶活性 Urease activity ( $N\ mg\ kg^{-1}\ 24h^{-1}$ )
CK'	0.1	0.007	36.0
CK	2.7 a	0.122 a	72.7 a
NK	9.0 ab	0.770 b	118 b
NP	12 b	0.693 b	112 b
PK	4.1 a	0.124 a	84.9 a
NPK	16 b	1.175 b	134 c

注:表中值为 3 个重复的平均值(CK' 除外)。同一列的不同字母代表差异显著( $p < 0.05$ ) Note: The values in the table were means of three replicates except CK'. Different letters in the same column represent significance of difference at  $p < 0.05$

表 6 土壤硝化率、硝化势与其他土壤因素的相关系数

Table 6 Pearson correlation coefficient between nitrification rate, nitrification potential and other soil properties

	$C_{org}$	TN	HN	$C_{mic}$	$N_{mic}$	脲酶 Urease
硝化率 Nitrate rate	0.566 *	0.564 *	0.558 *	0.652 **	0.598 *	0.773 **
硝化势 Nitrifi- cation potential	0.501 *	0.591 *	0.506 *	0.616 *	0.543 *	0.806 **

注: \*0.05 水平显著, \*\*0.01 水平显著 Note: \*Significant at the 0.05 level. \*\*Significant at the 0.01 level

活性的提高而显著增加( $R^2 = 0.792$  和  $0.597$ ,  $p < 0.001$ ),而脲酶活性则随着土壤水解氮(HN)和有效磷提高而显著增加( $R^2 = 0.692$ ,  $p < 0.001$ )。硝化率和硝化势与土壤 pH 无显著相关性。

## 3 讨论

原始对照土壤样品即荒地红壤(CK')的肥力水平很低,土壤有机碳含量仅  $2.64\ g\ kg^{-1}$ ,土壤中微生物生物量碳和氮、可培养微生物的数量、微生物群落功能多样性也低于改种水稻、施用不同无机肥料的各处理<sup>[17]</sup>。本研究结果表明,红壤原始土壤与种水稻后土壤中氨氧化细菌 16S rDNA DGGE 带谱相似性也最低(61%,图 3),表明荒地红壤改种水稻后土壤微生物群落结构发生变化的程度大于种稻土壤长期施用不同无机肥的处理。从推测的 -变形杆菌纲氨氧化细菌种类看,改种水稻后土壤中氨氧化细菌种类出现了增减,1 种亚硝化单胞菌消失,增加了 6 种亚硝化螺菌和 1 种亚硝化单胞菌(表 4),出现这种增减的原因还有待进一步研究。

在 DGGE 图谱中,处于不同位置的每条 DNA 带及其相对浓度(亮度)很可能代表微生物群落中某一特定微生物种及其在群落中的相对丰度<sup>[3]</sup>。本研究在 DGGE 图谱中显示出有 11~15 条氨氧化细菌 16S rDNA 带,即可能指示有 11~15 种氨氧化细菌。在 PCR-DGGE 方法中,由于 PCR 模板为土壤总 DNA,其中含可培养和不可培养氨氧化细菌的 DNA,所以该方法反映的氨氧化细菌种类比传统的分离培养方法得到的氨氧化细菌种类较多。文献报道表明<sup>[18,19]</sup>,用传统方法最容易分离到、研究最多的氨氧化细菌是亚硝化单胞菌属细菌,如欧洲亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea*),但是分子微生物生态学研究表明,数量最多、分布最广的氨氧化细菌是亚硝化螺菌属及亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)。本研究根据对 16S rDNA 测序结果推测,所研究土壤中的氨氧化细菌也大多是亚硝

化螺菌,少数是亚硝化单胞菌(表4)。

本研究显示,施用氮肥的各处理土壤硝化率和硝化势均高于未施用氮肥的各处理(表4),说明施用氮肥有利于硝化作用的进行,与相关文献报道相一致<sup>[20, 21]</sup>。许多研究表明,土壤pH是影响硝化作用的重要因素,低pH可限制硝化微生物的生长,不利于硝化作用的进行<sup>[9]</sup>,而施用尿素后因尿素迅速水解在短时间内使土壤pH上升可能提高土壤硝化作用<sup>[6]</sup>,硝化率与土壤pH呈显著正相关<sup>[11]</sup>。本研究中土壤样品于2003年3月即在土壤翻耕之前采集,尿素经过在上一年度内水稻、土壤的吸收利用,对pH的影响减弱,测定结果显示长期施用氮肥的各处理,土壤pH并未显著提高(表1)。相关分析显示,硝化作用与pH不呈现显著相关关系,表明施用氮肥提高硝化率和硝化势并非是土壤pH变化的结果。逐步回归分析表明,硝化率和硝化势均随着土壤脲酶活性的提高而显著增加( $R^2 = 0.792$ 和 $0.597$ ,  $p < 0.001$ ),而脲酶活性则随着土壤水解氮和有效磷提高而显著增加( $R^2 = 0.692$ ,  $p < 0.001$ )。因此,认为施用尿素可增加土壤水解氮含量,使水稻根系和土壤微生物产生更多脲酶<sup>[21]</sup>,促进土壤脲酶活性的提高和硝化细菌的生长<sup>[21]</sup>,进而提高硝化率和硝化势。

土壤中微生物数量与硝化活性的关系的文献报道结果并不一致。Chao等<sup>[13]</sup>报道,在5种热带和亚热带土壤中硝化细菌数量与土壤硝化率之间没有明显的相关性。但Pakele<sup>[12]</sup>则报道,在印度的黑土、红壤、水稻土、森林土和苏打土中,红壤具有最高的氨氧化菌和亚硝酸氧化菌数量,硝化势也最高。在所有供试土壤中硝化势与氨氧化菌和亚硝酸氧化菌数之间存在正相关性。丁洪等<sup>[6]</sup>也认为,硝化细菌(硝酸菌和亚硝酸菌)数量与土壤硝化率显著相关( $R^2 = 0.95$ ,  $p < 0.05$ )。本研究表明,施用氮肥的处理(NK、NP、NPK)的硝化率和硝化势均较未施用氮肥的处理(CK、PK)和荒地红壤CK'的高,对氨氧化细菌的16S rDNA的PCR扩增结果显示,施氮肥的处理中氨氧化细菌16S rDNA的PCR产物量明显高于其他土壤(表2)。在本研究中采用完全平行的实验操作:土壤DNA采用试剂盒提取,提取过程和提取液体积完全相同,PCR扩增中模板DNA使用量(体积)一样,PCR反应体系相同,在DGGE电泳中上样量相等。因此,施氮肥的处理中氨氧化细菌16S rDNA的PCR产物量明显较高很可能是这些处理的PCR模板浓度较高,即:施氮肥各处理的氨氧化细菌的数量高于不施氮肥的各处理。由此推测,长期施

用氮肥提高氨氧化细菌数量可能是施氮土壤硝化率和硝化势较高的原因之一。

## 参考文献

- [1] Hao W Y, Cao Z B. Microbes in red soils in China. In: Institute of Soil Science, Academia Sinica. ed. Proceeding of International Symposium on Red Soil. Beijing: Science Press, 1986. 274 ~ 285
- [2] Maarit N R, Ilse H, Kaisa W, et al. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. Journal of Microbiological Methods, 2001, 45 (1): 155 ~ 165
- [3] Muyzer G, de Waal E D, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied Environmental Microbiology, 1993, 59: 695 ~ 700
- [4] 宫曼丽, 任南琪, 邢德峰. DGGE/TGGE技术及其在微生物分子生态学中的应用. 微生物学报, 2004, 44 (6): 845 ~ 848. Gong M L, Ren N Q, Xing D F. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis in microbial molecular ecology (In Chinese). Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44 (6): 845 ~ 848
- [5] Kowalchuk G A, Bodelier P L E, Heilig G H J, et al. Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 27: 339 ~ 350
- [6] 丁洪, 王跃思, 项艳艳, 等. 福建省几种主要种稻红壤的硝化与反硝化活性. 农业环境科学学报, 2003, 22 (6): 715 ~ 719. Ding H, Wang Y S, Xiang H Y, et al. Nitrification and denitrification potential in different types of paddy soils in Fujian Province (In Chinese). Journal of Agro-environmental Science, 2003, 22 (6): 715 ~ 719
- [7] 李振高, 俞慎. 土壤硝化—反硝化作用研究进展. 土壤, 1997, 29 (6): 281 ~ 286. Li Z G, Yu S. Research advance in soil nitrification-denitrification (In Chinese). Soils, 1997, 29 (6): 281 ~ 286
- [8] 范晓晖, 林德喜, 沈敏, 等. 长期试验地潮土的矿化与硝化作用特征. 土壤学报, 2005, 42 (2): 340 ~ 343. Fan X H, Lin D X, Shen M, et al. Characteristics of mineralization and nitrification in the calcareous soils from a long-term fertilization experimental field (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2005, 42 (2): 340 ~ 343
- [9] Sahawet K L. Nitrification in some tropical soils. Plant and Soil, 1982, 65: 281 ~ 286
- [10] Christensen S, Simkins S, Tiedje J M. Spatial variation in denitrification-dependency of activity enters on the soil environment. Soil Science Society of America Journal, 1990, 54 (6): 1608 ~ 1613
- [11] 李辉信, 胡锋, 刘满强, 等. 土壤氮素的矿化和硝化作用特征. 土壤, 2000, 32 (4): 194 ~ 197. Li H X, Hu F, Liu M Q, et al. Characteristics of mineralization and nitrification of soil nitrogen (In Chinese). Soils, 2000, 32 (4): 194 ~ 197
- [12] Pakele N V. Nitrification potential of soils as influenced by soil mi-

- crobial population. *Karnataka Journal of Agriculture Science*, 1993, 6(1): 70~72
- [13] Chao WL, Gan KD, Chao CC. Nitrification and nitrifying potential of tropic and subtropical soils. *Biology and Fertility of Soils*, 1993, 15(2): 87~90
- [14] 鲁如坤主编. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000. Lu R K. ed. *Analytical Methods of Soil and Agrochemistry (In Chinese)*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000
- [15] Øvreas L, Forney L, Daae FL, *et al.* Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 1997, 63: 3367~3373
- [16] 萨姆布鲁克, 拉塞尔著. 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002. Sambrook J, Russell D W. Huang P T, *et al.* trans. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed. Beijing: Science Press, 2002
- [17] Zhong W H, Cai Z C. Long-term effects of inorganic fertilizers on microbial biomass and community functional diversity in a paddy soil derived from quaternary red clay. *Applied Soil Ecology*, 2007, 36: 84~91
- [18] Kowalchuk G A, Stienstra A W, Heilig G H J, *et al.* Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche (The Netherlands). *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 31: 207~215
- [19] Stephen J R, McCaig A E, Smith Z, *et al.* Molecular diversity of soil and marine 16S rDNA gene sequences related to  $\alpha$ -subgroup ammonia-oxidising bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, 62: 147~154
- [20] Nicolaisen M H, Risgaard-Petersen N, Revsbech N P, *et al.* Nitrification denitrification dynamics and community structure of ammonia oxidizing bacteria in a high yield irrigated Philippine rice field. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 49(3): 359~369
- [21] Swensen B, Bakken L R. Nitrification potential and urease activity in a mineral subsoil. *Soil Biology & Biochemistry*, 1998, 30: 1333~1341

## EFFECTS OF RICE CULTIVATION AND LONG TERM APPLICATION OF INORGANIC FERTILIZERS ON AMMONIUM OXIDIZERS DIVERSITY AND NITRIFICATION OF RED SOILS

Zhong Wenhui<sup>1,2</sup> Cai Zucong<sup>1†</sup> Yin Lichu<sup>3</sup> Zhang He<sup>4</sup>

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 College of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(3 College of Resources and Environmental Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(4 College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract** Effects of rice-planting and long-term application of inorganic fertilizers on  $\alpha$ -proteobacteria ammonium oxidizers diversity and nitrification were investigated in a soil derived from quaternary red clay in the Ecological Experimental Station of Red Soil, Chinese Academy of Sciences. The original soil is characterized by low pH and deficiency of available nutrients, particularly phosphorus and nitrogen. After 13 years of rice cultivation, the soil showed increase in number of DGGE bands of ammonium oxidizer 16S rDNA and a DGGE pattern different from that of the original soil with a similarity being only 61%, which illustrated variation in the community structure of the ammonium oxidizers in the soil. Besides, the research findings of the experiment on effect of long-term application of inorganic fertilizers on diversity of ammonium oxidizers in the soil with the PCR-DGGE method also showed that the treatments (NP, NPK & NK) in the experiment were quite similar to each other in 16S rDNA DGGE pattern, with a similarity being up to 73%. Both nitrification rate and nitrification potential were higher in the nitrogen fertilizer treatments than the other treatments. Stepwise regression analysis showed that nitrification rate and nitrification potential were evidently increased with the increase in urease activity. It may be presumed that application of urea increased soil hydrolysable nitrogen content, and hence urease activity and growth of nitrifying bacteria in the soil, which finally led to increase in nitrification rate and nitrification potential.

**Key words** Rice-planting red soil; Ammonium oxidizers; PCR-DGGE; Diversity; Nitrification rate; Nitrification potential