

稻田厌氧氨氧化菌群落结构对氮肥的响应*

宋亚娜 吴明基 林 艳

(福建省农业科学院生物技术研究所 福州 350003)

摘 要 为探明稻田厌氧氨氧化菌多样性及其对氮肥用量的响应状况,利用厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因特异引物对定位试验稻田土壤 DNA 进行 PCR-DGGE(聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳)并结合 DNA 克隆测序,研究了氮肥供应量对厌氧氨氧化菌群落结构的影响。DGGE 图谱及依据其条带位置和亮度数值计算的多样性指数均显示:高氮处理[N3: 225 kg(N)·hm⁻²]的厌氧氨氧化菌群落结构多样性在表层或根层土壤中均显著($P < 0.05$)高于中、低氮[N2: 150 kg(N)·hm⁻²; N1: 75 kg(N)·hm⁻²]处理和不施肥对照(CK);同时,高氮处理下表层土壤厌氧氨氧化菌群落多样性指数显著高于根层土壤($P < 0.05$)。冗余分析(RDA)结果表明,表层土壤中厌氧氨氧化菌群落结构组成与不同氮肥水平处理存在显著相关性($P = 0.006$)。此外,本试验获得厌氧氨氧化菌 DGGE 条带 DNA 序列 18 条,登录 GenBank 并获得登录号。研究表明稻田厌氧氨氧化菌群落结构对高氮水平具有较弱的响应,尤其是在表层土壤中。

关键词 厌氧氨氧化菌 群落结构 氮肥 稻田 PCR-DGGE 冗余分析

中图分类号: S154.3 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2013)04-0409-07

Response of anammox bacteria community structure to nitrogen in paddy soils

SONG Ya-Na, WU Ming-Ji, LIN Yan

(Institute of Biological Technology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract Anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria of phylum *Planctomycetes* origin have been identified to be responsible for N removal in terrestrial and aquatic environments through combined NH_4^+ oxidation and NO_2 reduction. Anaerobic ammonium oxidation mediated by anammox bacteria has been noted to be a key process of biogeochemical N cycle in various ecosystems. It was also possible to have anammox processes in flooded paddy fields because of the low oxygen habitat conditions. To investigate the existence of anammox bacteria and the bacteria community diversity response to applied N fertilizer in paddy fields, anammox bacteria community structures in paddy fields were investigated with the aid of denaturing gradient gel electrophoresis and cloning sequencing by assay 16S rRNA gene in the third year of N fertilizer experiment in the field. DGGE images of 16S rRNA gene in surface or root-zone soil showed rich anammox bacteria in paddy soils. The numbers of DGGE band in the images of surface soil or root-zone soil under high N level treatment [N3: 225 kg(N)·hm⁻²] were greater than those under other N levels [N2: 150 kg(N)·hm⁻², N1: 75 kg(N)·hm⁻² and CK: without fertilizer]. The Shannon-Wiener index based on the number and density of DGGE band showed significantly ($P < 0.05$) higher diversity of anammox bacteria in surface soil or root-zone soil under N3 treatment than N2, N1 or CK treatments. At the same time, Shannon-Wiener index of anammox bacteria in surface soil was markedly ($P < 0.05$) higher than in root-zone soil under N3 treatment. Redundancy discriminate analysis (RDA) based on 16S rRNA gene DGGE profiles showed significant correlation ($P = 0.006$) of anammox bacteria community structure in surface soils of paddy fields with different levels of N fertilizer application. RDA plot depicted that anammox bacteria community structure in surface soil under N3 treatment obviously differed from that under N1 or CK treatment. Furthermore, 18 DNA sequences cloning from DGGE band was obtained and logged in GenBank. The findings demonstrated that anammox bacteria community structure in paddy soils strongly responded to intensive N fertilizer use especially in surface paddy soils. Anammox bacteria possibly played a critical role in N cycle in paddy soil ecosystem.

* 国家自然科学基金项目(40801097)和福建省自然科学基金项目(2012J01107)资助

宋亚娜(1973—),女,副研究员,博士,主要从事微生物分子生态学研究。E-mail: syana@sina.com

收稿日期: 2012-09-03 接受日期: 2012-11-22

Key words Anammox bacteria, Community structure, N fertilizer, Paddy soil, PCR-DGGE, Redundancy discriminate analysis

(Received Sep. 3, 2012; accepted Nov. 22, 2012)

在氧供应不足或电子供体有限的自然生态系统中, 存在一种由浮霉状菌目(Planctomycetales)细菌驱动的厌氧氨氧化过程, 即厌氧氨氧化菌(anammox)以亚硝酸盐作为电子受体将氨氧化为 N_2 的过程^[1]。由于厌氧氨氧化菌对氧极度敏感、生长缓慢且在较高细菌浓度条件下才表现出厌氧氨氧化活性, 因此用传统的微生物分离、纯化培养方法来研究厌氧氨氧化菌的群落组成十分困难。现代分子生物学技术的迅速发展为厌氧氨氧化菌的研究提供了高效快捷的手段。目前已经鉴定到 8 个厌氧氨氧化菌种, 分别属于 5 个属, 16S rRNA 系统发育分析表明, 这些厌氧氨氧化菌都归属于浮霉状菌门(Planctomycetales)并构成了厌氧氨氧化菌科(Anammoxaceae)^[2]。

厌氧氨氧化菌的生长要求环境中同时存在氨和亚硝酸盐, 通常在沉积物和水体的有氧-无氧界面能满足这样的条件, 在许多水生环境中均发现了厌氧氨氧化作用^[3], 表明这一作用可能广泛存在于任何含氮低氧的生态系统中^[4]。同时, 结合 N^{15} 示踪技术, 对生物标志物、FISH 分析和 16S rRNA 基因的分析结果也均证实了厌氧氨氧化菌在自然界中广泛分布, 且在氮素循环中起着重要的作用^[5]。海洋和淡水生态系统中的厌氧氨氧化菌的研究较早较多, 近年来在不同陆地生态系统, 如沼泽、冻土和农田土壤中也检测到了不同种群的厌氧氨氧化菌^[6]。

水稻土及其稻田系统是环境友好、生态健康、可持续利用的人工湿地生态系统^[7]。稻田土壤氮素的累积、迁移、流失等生物地球化学循环过程是稻田生态系统可持续发展的重要保障之一。水稻生长过程中稻田土壤长期处于淹水状态, 可为厌氧氨氧化菌生长提供有利环境。因此, 稻田土壤中可能存在厌氧氨氧化过程。笔者通过 16S rRNA 基因分析, 发现在淹水红壤稻田土壤中存在较为丰富的厌氧氨氧化菌^[8]。但这些厌氧氨氧化菌的多样性、群落组成对环境因素的响应及其在稻田土壤氮素循环中的作用等问题都还不清楚。

本研究以田间定位试验为基础, 运用 PCR-DGGE (聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳)技术研究了稻田土壤中厌氧氨氧化菌群落结构对氮肥水平的响应, 为稻田厌氧氨氧化作用的深入研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

于 2009 年起在位于福州市寿山乡前洋村(26°11'N,

119°16'E)的福建省农业科学院生物技术研究所试验基地, 建立了水稻肥料定位试验。供试地点属暖湿的亚热带季风气候, 无霜期长达 326 d, 年平均气温 19.6 °C, 平均湿度 77%, 年均降水量 1 342.5 mm。供试土壤基本理化性状为: 有机质 16.87 g·kg⁻¹, pH 5.78, 全氮 1.29 g·kg⁻¹, 全磷 0.28 g·kg⁻¹, 全钾 19.39 g·kg⁻¹, 碱解氮 208.1 mg·kg⁻¹, 有效磷 15.97 mg·kg⁻¹, 速效钾 78.73 mg·kg⁻¹。

1.2 试验设计

试验设置低、中、高氮肥[N1: 75 kg(N)·hm⁻²; N2: 150 kg(N)·hm⁻²; N3: 225 kg(N)·hm⁻²]及不施肥的对照(CK)处理。氮肥种类为尿素, 磷肥和钾肥种类为过磷酸钙和氯化钾, 全部磷钾肥和 2/3 氮肥用做基肥, 1/3 氮肥在水稻分蘖后期追肥。3 个氮水平处理中磷肥和钾肥均分别为 60 kg(P₂O₅)·hm⁻² 和 150 kg(K₂O)·hm⁻², 对照试验不施氮磷钾肥。每个处理重复 3 次, 共 12 个田间小区随机排列, 小区面积 16 m², 种植密度 300 株·小区⁻¹。供试水稻品种为“天优 3301”(Oryza. sativa L. “Tianyou 3301”), 按当地常规进行水稻栽培的田间管理。在 2009—2011 年 3 年定位试验中水稻均做中稻栽培, 每年 5 月播种, 6 月移栽, 10 月收获。每年水稻收获后稻茬翻入土中, 下一年按前一年小区排列进行种植。于田间定位试验第 3 年的水稻抽穗期(2011 年 8 月)进行稻田土壤采集。每次重复取 5 株水稻, 整株挖起后取土层深度约 10~20 cm 的根系周围土壤(根层土), 5 株水稻根系取得的土壤混合为 1 个样品; 每个小区随机选 5 个点采集土层深度 0~5 cm 的土壤(表层土), 将 5 点采集的土壤混合为 1 个样品。田间采集的土样放入 4 °C 冰盒中保存, 于实验室内将混合后的土壤去除根系、杂草、土壤动物和石块等杂质并混匀后分成 2 份。一份于-20 °C 冷冻保存用于土壤微生物分析, 一份风干后进行土壤养分分析。

1.3 分析方法

1.3.1 土壤微生物总 DNA 提取

采用 FastDNA[®] SPIN Kit For Soil (Q-BIOgene) 的试剂盒方法, 称取 0.5 g 于-20 °C 保存的土壤样品, 按试剂盒的试验步骤进行土壤微生物总 DNA 的提取, DNA 样品-20 °C 冰箱保存待用。

1.3.2 聚合酶链式反应(PCR)

采用嵌套式 PCR, 第 1 步利用引物 pla46f/630r^[9] 对浮霉菌属进行 PCR 扩增, 第 2 步以第 1 步 PCR 产

物为模板, 利用厌氧氨氧化菌特异引物 Amx368f-GC/Amx820r^[9]扩增厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因。在引物 Amx368f 前加 1 个 GC 夹用来防止 DNA 在进行变性梯度凝胶电泳时过早解链。PCR 引物序列及扩增反应条件见表 1。第 1 套 PCR 反应体系 25 μL , 其中 2 μL 稀释 5 倍的土壤总 DNA 模板加反应液 23 μL , 反应液包括 0.5 μL Taq DNA 聚合酶(2.5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 天根生物公司, 北京), 2.0 μL dNTPs(2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 各碱基, 上海生物工程公司, 上海), 2.5 μL 10 \times PCR buffer(10 倍的 PCR 缓冲液, 天根生物公司, 北京),

前、后引物各 2 μL (5 $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 上海英骏生物工程公司, 上海)和 14 μL 超纯水。第 2 套 PCR 反应体系 50 μL , 其中 2 μL 第 1 套 PCR 产物 DNA 模板加反应液 48 μL , 反应液包括 1 μL Taq DNA 聚合酶(2.5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 天根生物公司, 北京), 4.0 μL dNTPs(2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 各碱基, 上海生物工程公司, 上海), 5.0 μL 10 \times PCR-buffer(10 倍的 PCR 缓冲液, 天根生物公司, 北京), 前、后引物各 4 μL (5 $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 上海英骏生物工程公司, 上海)和 30 μL 超纯水。对 PCR 产物进行琼脂糖电泳 EB(溴化乙脞)染色检查。

表 1 PCR 扩增引物及反应条件

Table 1 Primers and PCR conditions used for the study

目标微生物 Target group	引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	反应条件 Thermal profile
浮霉菌 Planctomycetes	Pla46f 630r	GGATTAGGCATGCAAGTC CAKAAAGGAGGTGATCC	95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 5 min at 95 $^{\circ}\text{C}$, followed by 35 cycles of 30 s at 94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min at 55 $^{\circ}\text{C}$, 1 min at 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min at 72 $^{\circ}\text{C}$
厌氧氨氧化菌 Anammox	Amx368-GC Amx820r	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGGG GGCACGGGGGTTTCGCAATGCCGAAAGG AAAACCCTCTACTTAGTGCCC	95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 5 min at 95 $^{\circ}\text{C}$, followed by 35 cycles of 30 s at 94 $^{\circ}\text{C}$, 45 s at 56 $^{\circ}\text{C}$, 1 min at 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min at 72 $^{\circ}\text{C}$

1.3.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

用 40 μL 第 2 套 PCR 产物, 采用梯度为 30%~55% 的 8% 的聚丙烯酰胺凝胶[化学变性剂为 100% 尿素 7 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 40%(体积比)的去离子甲酰胺]在 1 倍 TAE 缓冲液中 150 V 60 $^{\circ}\text{C}$ 下电泳 5 h。电泳后用 10 mL SYBR green I(Sigma)(1 倍 TAE 稀释 10 000 倍)核酸染料染色 45 min, 然后用 Bio-Rad 成像系统拍照。

1.3.4 序列系统发育分析

对 DGGE 图谱中主要的 DNA 条带进行回收, 用无 GC 夹的引物 Amx368f/Amx820r 扩增, 反应条件如表 1 所示。将 PCR 扩增产物利用 PMD-18 载体进行克隆测序(上海英骏生物工程有限公司)。将测序结果登陆 NCBI 通过 Blast 2.0 软件与 GenBank 中的已知序列比对来确定序列的微生物种类, 将序列递交 GenBank, 获得登录号(accession number): JX136678~JX136695。利用 MEGA 4.0 软件基于 DGGE 条带序列, 进行 Bootstrap 验证系统发育分析, 构建邻接法(neighbor-joining, NJ)系统发育树。

1.3.5 土壤理化性状分析

分别用 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 水土比 2.5 : 1 提取法测定土壤 pH, 酚二磺酸比色法测定土壤硝态氮含量, 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 浸提-靛酚蓝比色法测定土壤铵态氮含量, 重铬酸钾容量法测定土壤有机质含量, 碱解扩散法测定土壤碱解氮含量, 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 浸提法测定土壤速效磷含量, NH_4OAc 浸提火焰光度法测定土壤速效钾含量^[10]。

1.4 数据分析

用 Quantity One(Bio-Rad)软件对 DGGE 图谱中 DNA 条带的位置和亮度进行数字化, 计算厌氧氨氧化菌群落结构多样性指数 Shannon-Wiener index (H')= $-\sum(n_i/N)\times\ln(n_i/N)$ (n_i 为样品各个条带的亮度值, N 为样品所有条带亮度值的和)^[11-12]。采用 CANOCO 4.0(Microcomputer Power, Ithaca, USA)软件, 根据不同处理 DGGE 结果的条带亮度和位置的数字化数值对微生物群落结构组成进行冗余分析(redundancy discriminate analysis, RDA), 分析微生物群落结构组成与不同氮肥水平处理、土壤 pH、硝态氮、铵态氮、碱解氮、有效磷、速效钾和有机质等环境因素的相关性^[11-12]。利用 SPSS 13.0 软件进行数据方差分析。

2 结果与分析

2.1 氮肥供应量对土壤养分状况的影响

表 2 显示了不同氮肥水平处理下稻田表层土壤和根层土壤的养分状况。由此可见, 在表层土壤中, 不同处理之间的土壤 pH 和铵态氮含量没有显著差异, 氮肥处理(N1、N2 和 N3)的硝态氮含量显著($P<0.05$)高于不施肥对照(CK), 且在高氮(N3)处理下土壤碱解氮含量显著($P<0.05$)提高; 在根层土壤中, 不同处理间的土壤铵态氮含量也没有显著差异, 硝态氮含量在 3 个氮肥水平处理下均显著($P<0.05$)提高, 且中、高氮处理(N2 和 N3)显著($P<0.05$)高于低氮处理(N1), 随氮肥水平提高土壤碱解氮含量逐

表 2 不同氮肥水平处理下稻田表层和根层土壤养分性状
Table 2 Chemical properties in surface and root zone soil in the paddy field under different N fertilizer treatments

土层 Soil layer	处理 Treatment	pH (H ₂ O)	NH ₄ ⁺ -N (mg·kg ⁻¹)	NO ₃ ⁻ -N (mg·kg ⁻¹)	碱解氮 Alkali-hydrolyzable N (mg·kg ⁻¹)	有效磷 Available P (mg·kg ⁻¹)	速效钾 Available K (mg·kg ⁻¹)	有机质 Organic matter (g·kg ⁻¹)
表层 Surface	CK	5.86±0.22a	6.24±0.69a	4.78±0.80c	78.6±10.8bc	10.8±2.9a	41.3±6.3a	11.9±2.4a
	N1	5.90±0.23a	6.00±0.47a	8.49±1.14ab	79.1±6.8bc	12.2±1.2a	40.0±8.9a	10.6±1.3a
	N2	5.85±0.21a	5.07±0.89a	9.78±1.26a	86.5±5.5b	10.6±3.4a	49.0±8.4a	11.2±2.3a
	N3	5.65±0.17ab	5.29±0.56a	10.54±0.88a	100.0±3.5a	13.3±2.4a	49.8±9.6a	11.6±2.6a
根层 Root zone	CK	5.83±0.05a	6.12±0.73a	3.58±0.82c	69.7±4.8c	11.3±4.9a	41.3±4.1a	11.7±2.0a
	N1	5.53±0.11b	5.67±0.77a	6.73±0.96b	82.3±2.9b	11.4±1.3a	41.2±3.8a	11.4±1.6a
	N2	5.59±0.10b	5.52±0.35a	9.43±0.99a	82.7±5.1b	11.2±1.2a	42.3±3.4a	10.7±1.5a
	N3	5.41±0.10b	5.09±0.51a	8.80±1.06a	95.2±6.4a	11.3±1.2a	45.0±2.9a	11.3±1.1a

CK: 不施肥 No fertilization; N1: 75 kg(N)·hm⁻²; N2: 150 kg(N)·hm⁻²; N3: 225kg(N)·hm⁻²; 下同 The same below. 同列数据后不同字母表示差异显著($P < 0.05$) Different letters in the same column mean significant difference at $P < 0.05$.

渐增加, 呈 N3>N2、N1>CK 的显著趋势($P < 0.05$); 同时施用氮肥降低了稻田根层土壤 pH, N1、N2 和 N3 的土壤 pH 均显著($P < 0.05$)低于 CK。此外, 不同氮肥水平间稻田根层或表层土壤中磷、钾有效性和有机质含量均没有显著差异。

2.2 氮肥供应量对土壤厌氧氨氧化菌群落结构的影响

利用厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因特异引物对稻田土壤厌氧氨氧化菌的群落结构进行 PCR-DGGE 分析, 如图 1 所示。由 DGGE 图谱可见, 无论在表层土(图 1a)还是根层土中(图 1b), N3 处理的 DGGE 条带数量均明显多于其他处理, 且在不同处理的 DGGE 图谱相同位置的 DNA 条带中以 N3 处理的条带亮度较高。

基于厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因 DGGE 图谱中条带位置和亮度的数字化数值计算了厌氧氨氧化菌群落多样性指数(Shannon-Wiener index), 结果如图 2 所示。在表层土和根层土中, N3 处理的厌氧氨氧化菌群落多样性指数都显著($P < 0.05$)高于 N2、N1 和 CK 处理; 而且在高氮处理下(N3)表层土壤中厌氧氨氧化菌的群落多样性指数还显著($P < 0.05$)高于根层土壤。表明高氮处理显著提高了稻田土壤厌氧氨氧化菌群落多样性。

图 3 显示了利用 CANOCO 4.0 生态学软件, 基于 DGGE 图谱中 DNA 条带的位置和亮度进行的稻田表层土壤和根层土壤厌氧氨氧化菌群落结构组成的冗余分析(RDA)结果。由此可见, 表层土壤中不同处理的厌氧氨氧化菌群落组成在变异较大的 x 轴方向存在一定分布差异, 尤其是 N3 处理的 3 次重复均与 CK 或 N1 的分布存在明显差异(图 3a); 在根层土壤中不同氮肥水平处理的厌氧氨氧化菌群落结构组

成在变异较大的 x 轴方向上的分布差异不明显, N3 处理也仅有 2 次重复的分布距其他处理较远(图 3b)。同时冗余分析的显著性相关分析也显示, 表层土壤中厌氧氨氧化菌群落结构组成与不同氮肥水平处理存在显著正相关($P = 0.006$); 而根层土壤中厌氧氨氧化菌群落结构组成与不同氮肥水平处理及土壤理化性状等因素均没有相关性。上述结果表明氮肥水平提高对稻田表层土壤中厌氧氨氧化菌群落结构的影响较大。

2.3 稻田优势厌氧氨氧化菌种类分析

通过对 DGGE 图谱主要条带 DNA 序列分析研究定位试验稻田土壤中厌氧氨氧化菌主要种类。对主要的 DGGE 条带进行了 DNA 克隆测序, 获得厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因片段序列 18 条(m1~m18)(图 1)。在 GenBank 中进行 Blast 比对确定本研究分离到的厌氧氨氧化菌均归于不可培养的浮霉菌目(Unclutured *Planctomycete* sp.)。将不同序列登陆 GenBank 获得登录号: JX136678~JX136695。

进一步利用 MEGA4.0 软件构建 DGGE 条带序列和其在 GenBank 中进行 Blast 比对的最高相似序列的邻接法(NJ)系统发育树, 如图 4 所示。由此可见不同序列分别聚类为 2 大分支, 其中一个聚类分支中条带 m3 和 m6 相似性较高, 首先聚类, 条带 m13、m7、m8、m10、m1 和 m2 依次聚类, 上述 8 条序列总体相似性较高, 在 GenBank 的 Blast 比对中具有相同的最高相似序列; 而在另一大聚类分支中又存在 3 个主要分支, m14 和 m15 相似性较高, 具有相同的最高相似序列, 聚类在一支中, m4 和 m9 虽具有不同的最高相似序列, 但相似性仍较高, 聚类在一支中, m16、m11、m18、m17 和 m12 具有同一最高相似序列, 聚为另外一支, m5 与其他序列差异较大, 单独聚类。

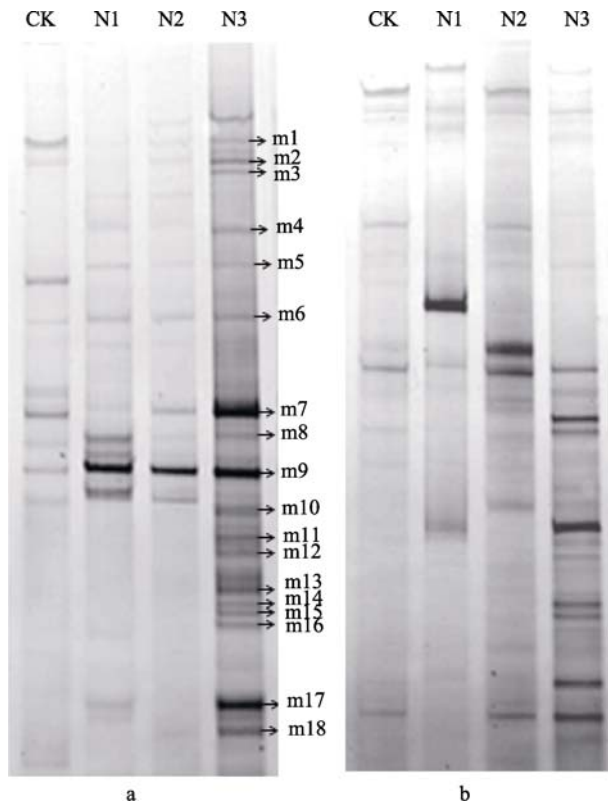


图 1 不同氮肥水平下稻田表层土壤(a)和根层土壤(b)中厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因的 DGGE 图谱
Fig. 1 Images of DGGE for 16S rRNA gene of anammox bacteria in surface soil (a) and root zone soil (b) of the paddy field under different N fertilizer treatments

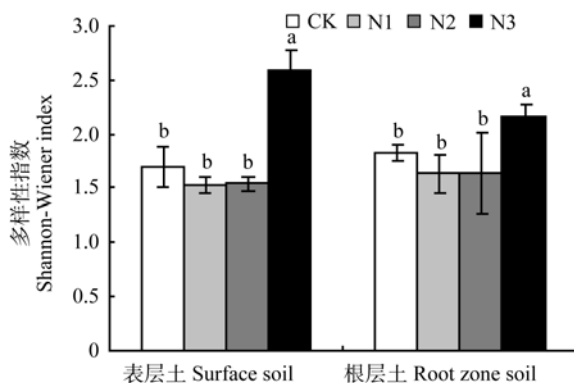


图 2 不同氮肥水平下稻田土壤厌氧氨氧化菌群落多样性
Fig. 2 Shannon-Wiener index of anammox bacteria community in the paddy field under different N fertilizer treatments
不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$) Values with different letters are significantly different at 0.05 level.

3 讨论

最初从人工生态系统中发现的厌氧氨氧化菌在许多自然生态系统中广泛分布, 并对氮素循环起着重要作用。如, 在海洋环境中厌氧氨氧化菌广泛分布, 且对海洋沉积物氮素循环的贡献率可高达 50% 以上^[13]。陆地生态系统中的某些缺氧区域可能同时存在 NH_4^+ 和 NO_2^- , 也可作为厌氧氨氧化菌生长提供

良好生境。研究证实, 在湿地、冻土和农田土壤中均存在厌氧氨氧化菌^[6,14]。研究同时认为土壤含水率和氮素含量等环境因子决定了厌氧氨氧化菌的存在与否及其群落结构多样性^[6]。含氮低氧的稻田土壤为厌氧氨氧化菌提供了生长条件, 16S rRNA 基因分析发现在淹水红壤稻田土壤中存在厌氧氨氧化菌^[8]。本研究通过对第 3 年田间定位试验的稻田土壤分析发现, 高氮处理 $[225 \text{ kg(N)} \cdot \text{hm}^{-2}]$ 可促进土壤厌氧氨氧化菌群落多样性的增加, 稻田表层和根层土壤的厌氧氨氧化菌群落多样性指数在高氮处理下均显著提高($P < 0.05$); 同时表层土壤厌氧氨氧化菌群落结构组成与不同氮肥水平显著相关($P = 0.006$)。此外, 高氮处理下, 稻田表层土壤厌氧氨氧化菌的群落多样性指数还显著高于根层土壤($P < 0.05$)。上述不同氮肥水平处理的稻田土壤厌氧氨氧化菌群落组成和多样性的变化与土壤硝态氮和碱解氮含量的变化较一致。可初步推断氮肥用量增加提高了土壤氮素有效性, 从而会促进稻田土壤厌氧氨氧化菌群落多样性的提高及其结构组成的改变。

本研究中用于厌氧氨氧化菌研究的基因是 16S rRNA 基因。由于厌氧氨氧化菌与其他细菌存在复杂的进化关系, 其 16S rRNA 基因序列差异较大, 有时在 16S rRNA 上只有 85% 的同源性^[2]。所以, 在针对厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因扩增中, 常常会扩增到非目的基因序列, 降低环境中厌氧氨氧化菌多样性研究的准确性。若结合厌氧氨氧化菌功能基因的研究, 将能更准确有效地分析环境中厌氧氨氧化菌多样性及其功能。此外, 缺氧环境中可能是由厌氧氨氧化造成的氮损失却常常被认为是反硝化过程的结果, 由于厌氧氨氧化与反硝化的效果相同, 用传统的同位素示踪方法不易区分, 还需要利用其他示踪技术和基因标记的方法来研究环境中厌氧氨氧化过程。如利用稳定性同位素核酸探针(DNA-SIP)技术分析厌氧氨氧化菌某些功能基因的活性, 将能更直接有效地研究环境中厌氧氨氧化活性。

近年来, 研究发现厌氧氨氧化反应的关键酶之一是位于厌氧氨氧化单体上的胍氧化酶(hydrazine-oxidizing enzyme, HZO), HZO 及其基因(*hzo*)已经在一些相关微生物体内得到了鉴定^[15]。*hzo* 基因系统发育分析揭示至少存在 3 类厌氧氨氧化菌 *hzo* 基因序列, 其中至少一类与已公布的厌氧氨氧化菌的 16S rRNA 的系统发育分析相一致^[16]。因此, *hzo* 基因可初步作为功能标记基因用于分析环境中的厌氧氨氧化菌。目前, *hzo* 基因已经被作为功能标记基因用于海洋、河流等水体系统中厌氧氨氧化菌群落的

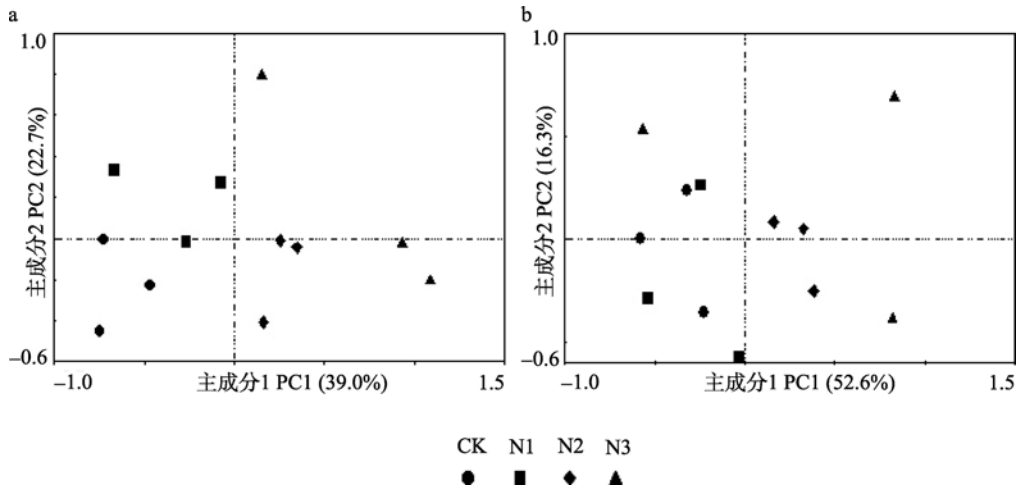


图 3 不同氮肥水平下稻田表层土壤(a)和根层土壤(b)中厌氧氨氧化菌群落组成的冗余分析
Fig. 3 RDA analysis of community composition of anammox bacteria in surface soil (a) and in root zone soil (b) of the paddy field under different N fertilizer treatments

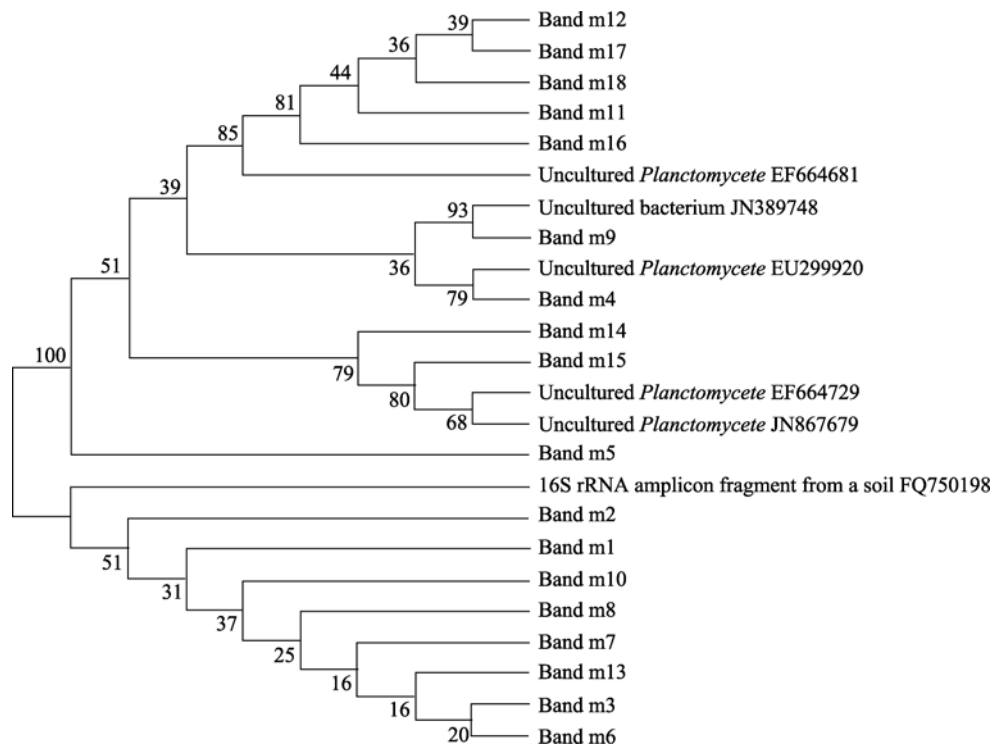


图 4 基于 DGGE 条带序列的稻田厌氧氨氧化菌邻接法系统发育树
Fig. 4 Neighbor-joining tree based on DGGE band sequences of anammox bacteria in the paddy field

研究^[17],但在土壤生态系统中的应用还鲜有报道。若在本研究基础上,进一步结合 *hzs* 功能基因的分析,将有助于进一步深入揭示稻田厌氧氨氧化菌群落多样性及其生态功能。

参考文献

[1] Strous M, Fuerst J A, Kramer E H M, et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete[J]. Nature, 1999, 400(6743): 446-449
[2] 沈李东, 郑平, 胡宝兰. 自然生态系统中的厌氧氨氧化[J]. 生态学报, 2011, 31(15): 4447-4454

Shen L D, Zheng P, Hu B L. Anaerobic ammonium oxidation in natural ecosystems[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(15): 4447-4454
[3] Junier P, Molina V, Dorador C, et al. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AMO) in the environment[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(3): 425-440
[4] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展[J]. 生态学报, 2009, 29(1): 406-415
He J Z, Zhang L M. Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle[J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(1): 406-415

- [5] Schmid M C, Mass B, Dapena A, et al. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 1677-1684
- [6] Humbert S, Tarnawski S, Fromin N, et al. Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: Distribution and diversity[J]. The ISEM Journal, 2010, 4(3): 450-454
- [7] 曹志洪, 林先贵, 杨林张, 等. 论“稻田圈”在保护城乡生态环境中的功能 II. 稻田土壤氮素养分的累积、迁移及其生态环境意义[J]. 土壤学报, 2006, 43(2): 256-260
Cao Z H, Lin X G, Yang L Z, et al. Ecological function of “paddy field ring” to urban and rural environment II. Characteristics of nitrogen accumulation, movement in paddy field ecosystem and its relation to environmental protection[J]. Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(2): 256-260
- [8] 宋亚娜, 林智敏, 陈在杰, 等. 荧光定量 PCR 技术检测红壤稻田土壤厌氧氨氧化细菌[J]. 福建农业学报, 2010, 25(1): 82-85
Song Y N, Lin Z M, Chen Z J, et al. Real-time PCR quantification of anaerobic ammonia-oxidizing microorganisms in red paddy soil[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2010, 25(1): 82-85
- [9] Tal Y, Watts J E M, Schreier H J. Anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and associated activity in fixed-film biofilters of a marine recirculating aquaculture system[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(4): 2896-2904
- [10] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007
Bao S D. Soil analysis in agricultural chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2007
- [11] Alvey S, Yang C H, Buerkert A, et al. Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in West African soils[J]. Biology and Fertility of Soils, 2003, 37(2): 73-82
- [12] Marschner P, Neumann G, Kania A, et al. Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.)[J]. Plant and Soil, 2002, 246(2): 167-174
- [13] Kuenen J G. Anammox bacteria: from discovery to application[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(4): 320-326
- [14] Zhu G B, Jetten M S M, Kuschk P, et al. Potential roles of anaerobic ammonium and methane oxidation in the nitrogen cycle of wetland ecosystems[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(4): 1043-1055
- [15] Shimamura M, Nishiyama T, Shigetomo H, et al. Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(4): 1065-1072
- [16] Schmid M C, Hooper A B, Klotz M G, et al. Environmental detection of octahaem cytochrome c hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(11): 3140-3149
- [17] Hirsch M D, Long Z T, Song B. Anammox bacterial diversity in various aquatic ecosystems based on the detection of hydrazine oxidase genes (*hzoA/hzoB*)[J]. Microbial Ecology, 2011, 61(2): 264-276