

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (9) :1190 – 1200; 4 September 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20140608

艾比湖湿地三种植物根际土壤氨氧化细菌群落的多样性

王翠华, 武菲, 胡文革*, 莫超, 张晓红

石河子大学生命科学学院, 新疆 石河子 832000

摘要:【目的】以艾比湖湿地盐节木 (*Halocnemum strobilaceum*)、芦苇 (*Reed*) 及盐角草 (*Salicornia*) 三种植物为对象, 研究其根际土壤氨氧化细菌 (AOB) 的群落多样性。【方法】利用 PCR-RFLP 的方法, 构建氨氧化细菌 *amoA* 基因克隆文库, 进行系统发育分析。结合三种植物根际理化因子特点, 探讨三种植物根际 AOB 群落结构组成的特点。【结果】通过序列多态性分析表明, 三种植物根际土壤 AOB *amoA* 基因克隆文库中的所有序列均属于 β 亚纲 (β -*Proteobacteria*) 中的亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 及 *Nitrosomonas-like*, 未发现亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*)。三个 AOB *amoA* 基因克隆文库分别包括 9 个 OTUs、12 个 OTUs 和 7 个 OTUs, 其文库覆盖度均达 99% 以上, 代表性强。三个文库的丰富度、Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数均为 R > H > S。【结论】三种植物的 AOB 多样性为芦苇 > 盐节木 > 盐角草, 并且其最优氨氧化菌群各不相同。本研究为系统认识艾比湖湿地植物根际氨氧化细菌群落多样性和结构组成提供了基础。

关键词: 根际, 氨氧化细菌, *amoA* 基因, PCR-RFLP, 克隆文库

中图分类号: Q938 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 09-1190-11

硝化作用是全球氮循环中非常关键的一个环节, 包括两个过程。首先由氨氧化细菌将氨态氮 (NH_3^-) 氧化为亚硝酸 (NO_2^-), 再由亚硝酸细菌将亚硝酸氧化为硝态氮 (NO_3^-) 的过程, 由于亚硝酸极不稳定, 易被氧化为硝酸, 因此由氨氧化细菌进行的第一步氧化过程成为整个硝化过程的限速步骤^[1-3]。目前, 氨氧化细菌已经成为理想的微生物生态学研究的模式微生物^[4]。因为 *amoA* 基因序列可编码直接参与氨氧化过程的酶, 其基因序列差异程度预计超过 16S rRNA 基因序列, 因此可能具有更高的对细菌菌群遗传差异分辨力, 其遗传差异也更能反映特定种群的差异, 氨氧化菌群种类数量及其种群生态分布的变化, 将直接或间接影响土壤养

分循环、水体富营养化、温室气体 (N_2O) 和生态系统的功能^[5]。所以, 基于 *amoA* 基因序列的分子系统学分析具有较高的灵敏度和特异性, 目前已被大量用于 AOB 分子多态性研究^[6]。

湿地系统是陆地和水生生态系统间的重要过渡区, 具有保持生物物种多样性、拦截和过滤物质流、净化水体、保持水土等多重生态服务功能^[7]。新疆艾比湖湿地属于湖泊湿地、沼泽湿地及河流湿地的组合, 具有这些湿地的共性, 且属于绿洲荒漠化干旱半干旱盐化极端环境, 新疆盐生植物芦苇、盐角草、盐节木等是艾比湖湿地主要代表性植被类型之一, 在盐渍生境中起着极其重要的建群作用, 它们在维护艾比湖湿地生态功能上发挥积极作用。氮循环是

基金项目: 国家自然科学基金 (31160026); 石河子大学高层次人才科研启动资金专项项目 (RCZX201010)

* 通信作者。E-mail: hwg-t@163.com

作者简介: 王翠华 (1989 -), 女, 内蒙古人, 硕士研究生, 研究方向为生理代谢与发酵工程。E-mail: haocuihua880702@163.com

收稿日期: 2014-12-22; **修回日期:** 2015-01-31

湿地生态系统重要的元素循环之一, 决定湿地营养状况水平。根际微生物是根际微环境与土壤物质循环和转换的枢纽, 对植物的生长发育起着重要作用^[8-10]。参与艾比湖湿地盐渍生境氮循环硝化作用的氨氧化细菌研究仅见于陈登稳等研究了不同土壤深度中氨氧化细菌数量的空间分布^[11], 而对这些建群植物根际氨氧化细菌的多样性组成特点还未见研究报道。本文采用构建 *amoA* 基因克隆文库的方法, 对盐节木、芦苇、盐角草三种主要的植物类群的根际氨氧化细菌多样性进行较为全面的认识。旨在对潜在的环境影响因素进行初步探讨, 为湖泊湿地的退化恢复提供理论和数据基础。

1 材料和方法

1.1 研究区概况

艾比湖湿地是我国不多见的荒漠风口湖泊湿

地, 为湖泊退化形成的湿地, 长年受阿拉山口大风的影响, 特殊的地理位置和生态系统的脆弱性, 凸显出湖水面和湖边分布的植被具有很好的防风固沙作用, 同时, 对入湖水的减少、植被的退化等变化非常敏感^[12]。艾比湖是由博尔塔拉河、精河、奎屯河、四棵树河等大大小小的河流汇聚而成, 由于近年来节流和人们不合理的开发利用, 沙尘天气和荒漠化正日趋严重。本区为典型大陆性气候, 干燥少雨多风, 四季气候悬殊, 冬、夏季漫长, 春、秋季短暂。年平均气温 5 °C, 平均降水量为 105.17 mm, 蒸发量为 1315 mm^[13]。艾比湖湿地植物区系属古北界蒙新区北疆荒漠区准噶尔荒漠小区, 植物种类较多, 主要典型的植被群落除梭梭群落、胡杨群落、芦苇群落外, 在平原低地还有柽柳群落、甘草群落、小獐茅群落。湖滨盐沼地有盐穗木群落、盐节木群落、碱蓬、盐角草群落分布^[14-15]。采样点基本情况见表 1。

表 1. 采样点信息

Table 1. The basic information of sampling sites

Sampling code	Vegetation form	Agrotype	Longitude	Latitude	Altitude
H	<i>Haloecnemum strobilaceum</i>	Clay, Sandy loam soil	82°48'49.8"E	44°50'51.6"N	186
R	<i>Reed</i>	Clay, Sandy loam soil	82°49'50.0"E	44°49'58.7"N	189
S	<i>Salicornia</i>	Sandy loam soil	82°56'04.1"E	44°47'59.9"N	186

1.2 材料

1.2.1 样品采集及预处理: 于 2013 年 7 月, 对艾比湖湿地以盐节木、芦苇、盐角草为主要植物群落区域的三个样地进行定点取样。每个样地随机设置 10 m × 10 m 的样方, 用五点采样法采取三种植物的根际土壤分别装于无菌袋中并贴上标签。用手提式冰箱迅速带回实验室保存于 -80 °C 冰箱用于 DNA 提取, 部分土壤自然风干, 过 100 目筛用于理化性质分析。

1.2.2 主要试剂及仪器: PCR 仪, 高速冷冻离心机。PCR 纯化试剂盒, PCR 试剂, pMD18-T 载体, *Msp* I 和 *Hae* III 限制性内切酶, 购于 TaKaRa。

1.3 艾比湖湿地三种植物根际土壤样品理化因子测定^[16]

土壤含水量测定采用 105 °C 烘干比重法; pH 测定采用电位法, 使用 PHS-3C 型酸度计测定, 土壤浸提液制备水土比例 5:1; 盐度测定采用电导法测定, 使用 DJ-320 电导仪测定; 有机质含量测定用重铬酸钾容量法, 外加热法; 碱解氮含量用碱解扩散法测

定; 速效磷含量测定采用碳酸氢钠浸提, 钼锑抗比色法测定; 速效钾含量用乙酸铵浸提火焰光度法测定。铵态氮测定采用次氯酸钠氧化靛酚蓝比色法, 硝态氮 (NO_3^- -N) 测定采用饱和硫酸钙溶液浸提, 酚二磺酸比色法。样品设置 3 个重复, 取其平均值。

1.4 土壤总 DNA 的提取

用 PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio 公司) 试剂盒提取。

1.5 氨氧化细菌 *amoA* 基因 PCR 扩增及产物纯化回收

amoA 基因扩增所用引物: *amoA*-1F: 5'-GGGGTTTCTACTGGTGCT-3', *amoA*-2R: 5'-CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC-3' (K = G/T, S = G/C)。PCR 扩增体系: 2 × PCR mix 10 μL, 10 μmol/L 引物各 0.75 μL, 模板 3 μL, 用无菌 ddH₂O 补足 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。分别对三个土壤样品中 AOB 的 *amoA* 基因进行扩增, PCR 产物经 1% 的琼脂

糖凝胶检测,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行切胶回收。

1.6 氨氧化细菌 *amoA* 基因克隆文库的构建及阳性克隆的筛选

将纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,将连接产物转化入 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞。在涂有 X-gal 和 IPTG 的含 Amp 的 LB 平板上进行蓝白斑筛选,随机挑取 288 个克隆子进行阳性检测。检测为阳性的克隆子保存在 96 孔板,于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.7 RFLP 酶切分型

将筛选出的阳性克隆子的 *amoA* 基因 PCR 产物用 2 种限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hae* III 进行限制性片段长度多态性分析 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)。10 μ L 酶切体系:10 \times Buffer 2 μ L,10 U/ μ L *Hae* III (或 *Msp* I) 1 μ L,PCR 纯化产物 7 μ L。37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h 后,1 μ L 10 \times Loading Buffer 终止反应。酶切产物用 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测。综合双酶切图谱,划分酶切谱型,将每个谱型的克隆子送若干个到上海生工测序公司测序。

1.8 克隆文库多样性指数与系统发育分析

测序得到的序列用 DNAMAN 比对后去除载体序列,用 Mothur 软件将相似性 $\geq 97\%$ 的序列划分为一个 OTU (Operational taxonomic unit, 可分类操作单元)。在每个 OTU 中选取 1 个具有代表性的克隆序列 (当该 OTU 含有的克隆序列多于 1 个),与 NCBI 网络数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行 BLAST 比对,选取相似度最高的序列作为参照序列,用 MEGA version 6.0 软件构建系统发育树,分析三

种植物根际氨氧化细菌群落结构特点。测定的序列已提交至 GenBank。H 登录号: KP126525 - KP126604; R 登录号: KP196614 - KP196711; S 登录号: KP196712 - KP196773。

采用文库覆盖度 Coverage *C* 评价构建文库对环境微生物多样性的呈现程度 ($C = 1 - n_1/N$, *N* 为所分析的克隆总数, n_1 为仅有一个克隆的操作分类单位数),使用 Origin 绘制 Rarefaction 曲线评估所构建的文库是否较好的反映了环境微生物多样性。用丰富度、Chao1、ACE、Shannon 等指数来比较三种植物根际氨氧化细菌群落多样性水平。

2 结果

2.1 三种植物根际土壤理化因子分析

由表 2 可知,三种根际土壤样品的各理化性质有明显差异。样品土壤均显碱性,pH、铵态氮、速效氮、速效磷、盐度为盐节木(H) > 盐角草(S) > 芦苇(R),样品的土壤含水量、有机质含量则相反,为芦苇(R) > 盐角草(S) > 盐节木(H),硝态氮的含量为盐角草(S) > 盐节木(H) > 芦苇(R)。由此可见,艾比湖湿地土壤为碱性土壤,因农耕而进行的长期的节流以及夏季高的蒸发量已对艾比湖湿地土壤造成了一定影响,使艾比湖湿地的含水量下降,低于正常湿地水平。参照全国第二次普查土壤分级标准,艾比湖湿地三种植物根际土壤除速效磷的含量属于一级水平外,其他理化性质含量均较低,说明艾比湖湿地三种植物根际土壤较为贫瘠,换言之,艾比湖湿地荒漠化趋势较为明显。

表 2. 三种植物根际土壤的基本特征平均值

Table 2. The average value of basic characteristics of three rhizosphere soil

Sample	pH	Soil moisture /%	SOM /(g/kg)	NO ₃ ⁻ -N /(mg/kg)	NH ₄ ⁺ -N /(mg/kg)	AN /(mg/kg)	AP /(mg/kg)	Salinity /(ms/cm)
H	9.01	13.28	1.47	1.22	9.63	89.83	114.24	9.10
R	8.44	17.64	6.45	1.03	7.04	60.9	99.41	2.67
S	8.74	13.76	5.38	1.36	8.79	88.66	113.97	4.37

2.2 三种植物根际土壤氨氧化细菌 *amoA* 基因克隆文库的构建及 RFLP 酶切分型

对湿地土壤氨氧化细菌 *amoA* 基因文库中的阳性克隆进行菌落 PCR,以验证插入片段大小在 491 bp 左右 (图 1)。盐节木(H)、芦苇(R)、盐角草(S) 3 个

文库分别得到 270、281、275 个阳性克隆子。经 *Msp* I 和 *Hae* III 限制性内切酶双酶切后,分析计算谱型和频率。每个不同的 RFLP 谱型 (图 2) 随机挑若干个阳性克隆子测序。其中 H 样品获得 81 条序列,R 样品获得 100 条序列,S 样品获得 64 条序列。

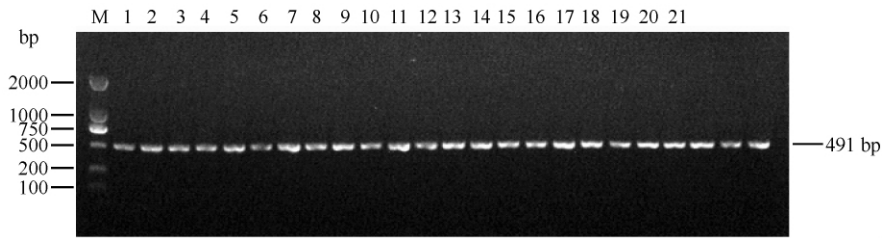


图 1. 氨氧化细菌 *amoA* 基因克隆文库阳性克隆检测部分结果

Figure 1. Partial results of positive clone of *amoA* gene clone library of AOB.

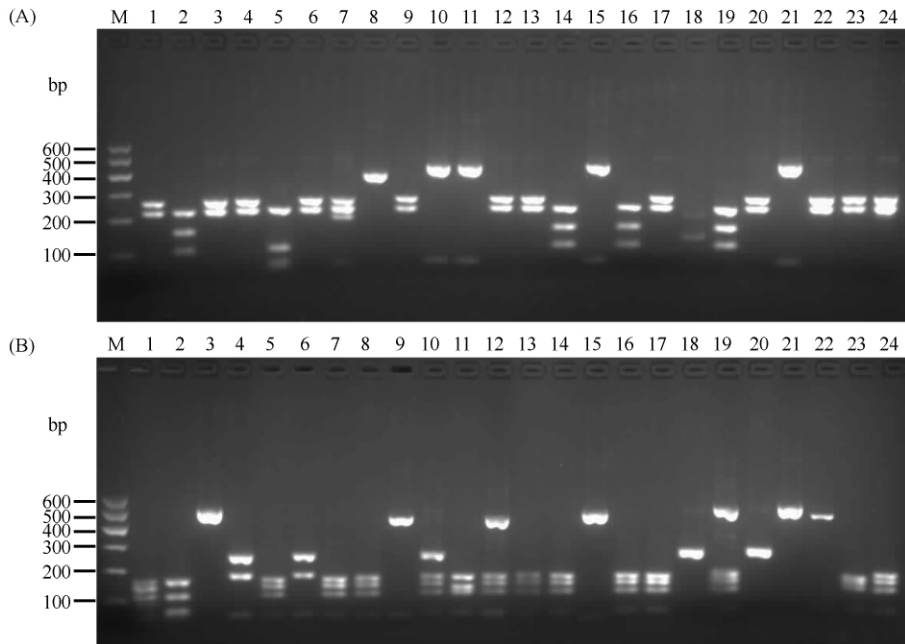


图 2. 氨氧化细菌 *amoA* 基因克隆文库部分酶切图谱

Figure 2. Partial results of restriction patterns of *amoA* gene clone library of AOB. A: *Msp* I restriction patterns; B: *Hae* III restriction patterns; M: marker.

2.3 三种植物根际土壤氨氧化细菌 *amoA* 基因克隆文库多样性分析

利用 Mothur 软件划分 OTU, 盐节木 (H)、芦苇 (R)、盐角草 (S) 三个样品分别得到 9、12、7 个 OTUs。通过对每个谱型克隆子数和 OTU 序列的计算得到: H-OTU1、H-OTU3、H-OTU6 为 H 样品中氨氧化细菌的优势菌群, H-OTU3 为 H 样品中氨氧化细菌的最优菌群; R-OTU1、R-OTU2、R-OTU6 为 R 样品中氨氧化细菌的优势菌群, R-OTU6 为 R 样品中氨氧化细菌的最优菌群; S-OTU1、S-OTU2、S-OTU3 为 S 样品中氨氧化细菌的优势菌群, S-OTU1 为 S 样品中氨氧化细菌的最优菌群。详见图 3。

通过计算得出, 三种植物根际土壤氨氧化细菌

amoA 基因克隆文库覆盖度分别为 99.26%、99.29%、99.27% (表 3), 各样点稀缺性曲线也显示出各文库用于测序的克隆数量达到或接近饱和 (图 4), 表明本研究所得的氨氧化细菌种群信息较好地代表了真实环境中的氨氧化细菌多样性。

在种水平上 ($distance = 0.03$), 通过覆盖度、丰富度、Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数分析三种植物根际氨氧化细菌多样性 (表 3)。因为丰富度、Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数均随着多样性的增大而数值增大, 本研究得出的三种植物根际氨氧化细菌的各种指数大小均为 (R) > 盐节木 (H) > 盐角草 (S)。由此可以说明三种植物根际氨氧化细菌多样性水平为芦苇 (R) > 盐节木 (H) > 盐角草 (S)。

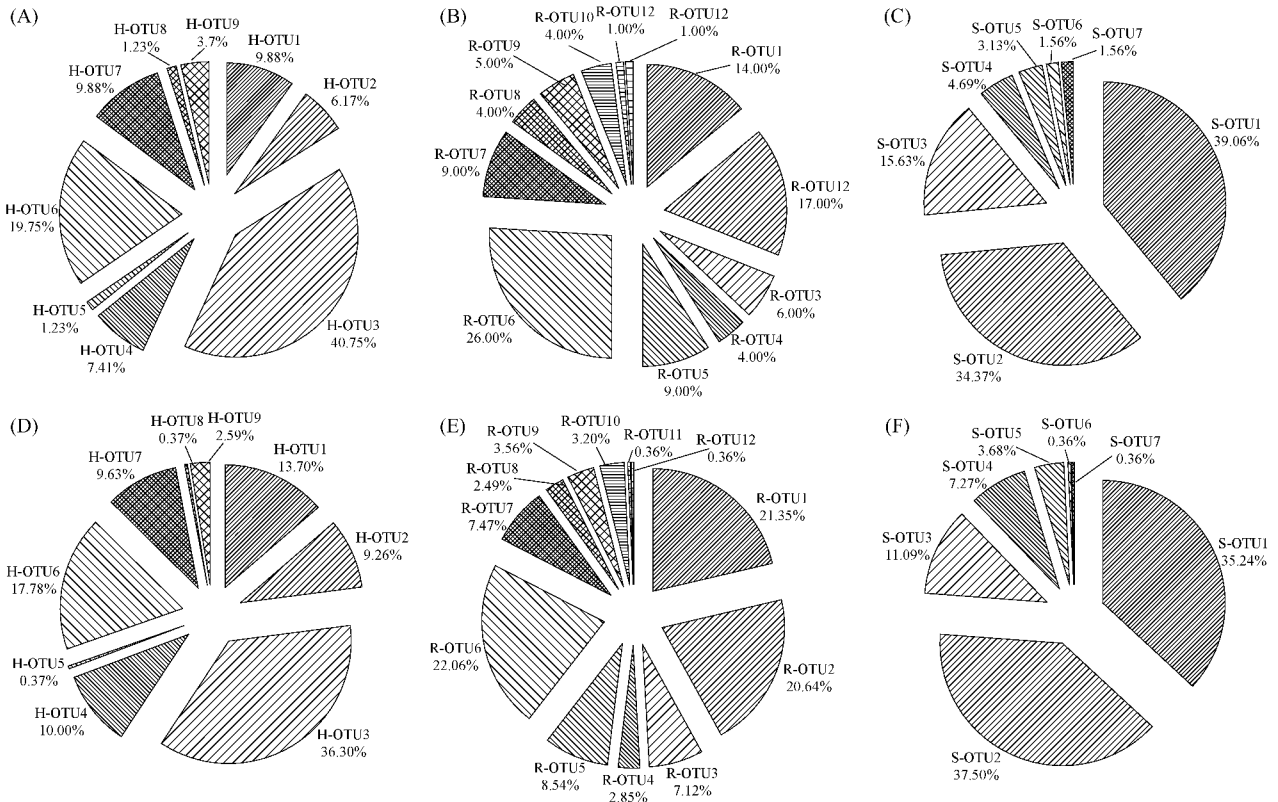


图 3. 三种植物氨氧化细菌 *amoA* 基因克隆文库群落组成

Figure 3. Community composition of AOB *amoA* gene clone library of three plants. A, B, C was based on number of sequence type, A: H clone library, B: R clone library, C: S clone library; D, E, F was based on number of clone, D: H clone library, E: R clone library, F: S clone library.

表 3. 基于种水平的各样点 AOB *amoA* 基因克隆文库多样性指数

Table 3. Diversity indices based on species-level of *amoA* gene clone libraries of AOB in samples

Source	Distance	Coverage	Rechness	Chao1	ACE	Shannon
H	0.03	99.26	9	10	10.03	1.74
R	0.03	99.29	12	13	12.86	2.16
S	0.03	99.27	7	7.5	10.03	1.47

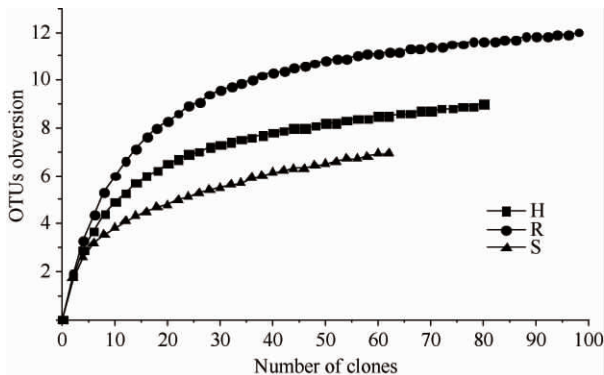


图 4. 各样品稀疏曲线

Figure 4. Rarefaction curves of different samples.

2.4 三种植物根际土壤氨氧化细菌系统发育及群落结构组成分析

每个 OTU 随机选择一个序列与已知环境样品中的序列共同构建系统发育树,所有序列归为 5 个簇(图 5)。根据盐节木(H)、芦苇(R)、盐角草(S)三个环境样品在 5 个簇中所占 OTU 数量的多少分析各环境样品氨氧化细菌群落结构组成(图 6)。

可知, AOB *amoA* 基因克隆文库包括 β -Proteobacteria 中的 *Nitrosomonas* 和 *Nitrosomonas-like*, 以及与 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4213 基因组的部分序列相似度为 95% 的 S-OTU6, 没有发现

Nitrosospira 及 *Nitrosospira-like*。其中盐节木(H)样品中氨氧化细菌均属于 *Nitrosomonas*, 芦苇(R)和盐角草(S)样品中的绝大多数克隆子属于 *Nitrosomonas*, 只有极少数属于 *Nitrosomonas-like*。

Cluster *Nitrosomonas communis* 包括盐节木(H)样品中的 H-OTU6、H-OTU7、H-OTU8、H-OTU9 和芦苇(R)样品中的 R-OTU5、R-OTU6、R-OTU7、R-OTU8、R-OTU9, 以及盐角草(S)样品中的 S-OTU1、S-OTU4、S-OTU5 与来自中国水产养殖沉积物、中原油田含油土壤、富营养化的乌梁素海湖、亚热带沿海红树林湿地沉积物、长江河口沉积物、中国北部淡水湿地保护区、工业废水接收河口沉积物及内蒙古高

盐碱湖中的克隆子聚为一簇, 说明其可能为潜在的嗜盐微生物类群。Cluster *Nitrosomonas* sp. Nm143 包括 H-OTU1 和 R-OTU4, 与来自多米尼加共和国的海洋河口沉积物及日本大叶藻区沙地中的克隆子聚为一簇, 盐角草(S)文库中未发现这一类群的氨氧化细菌。Cluster *Nitrosomonas oligotropha* 包括盐节木(H)样品中的 H-OTU2、H-OTU3、H-OTU4、H-OTU5 和芦苇(R)样品中的 R-OTU1、R-OTU2、R-OTU3、R-OTU11、R-OTU12 以及盐角草(S)样品中的 S-OTU2、S-OTU3 主要与来自富营养化的乌梁素海湖的克隆子及沿海水产养殖沉积物、中原油田含油土壤、中国北部淡水湿地保护区的克隆子聚为一

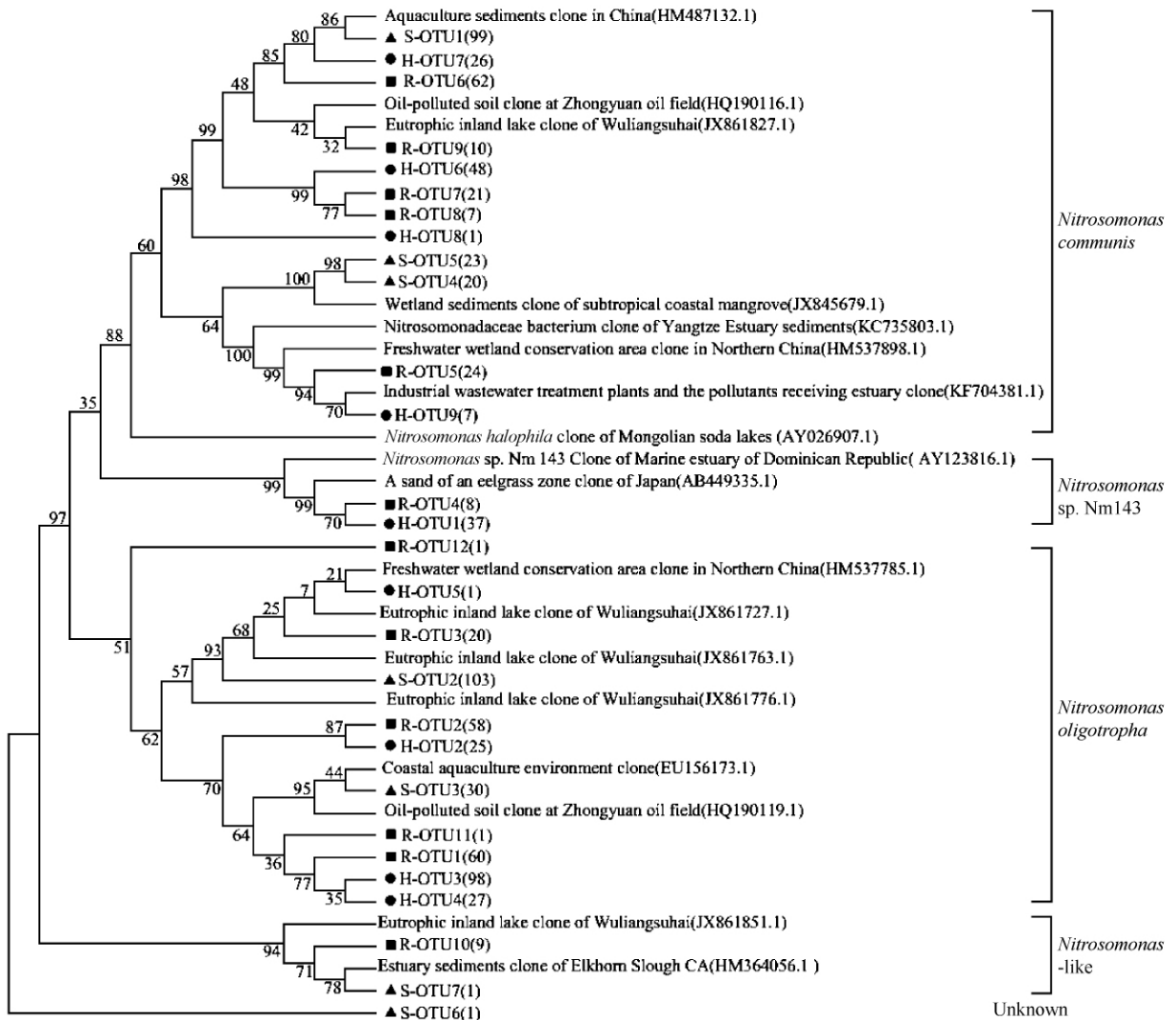


图 5. 基于氨氧化细菌 *amoA* 基因序列构建的系统发育树

Figure 5. Phylogenetic tree based on *amoA* partial sequences conducted using MEGA version 6.0. Every bracket behind of OTU is the number of clone, every bracket behind of reference sequence is the sequence number. ●: H clone library, ■: R clone library, ▲: S clone library.

簇。Cluster *Nitrosomonas-like* 包括 R-OTU10 和 S-OTU7, 与来自富营养化的乌梁素海湖及美国艾尔克豪恩沼泽河口沉积物中的克隆子聚为一簇, 盐节木 (H) 文库中未发现此类群。

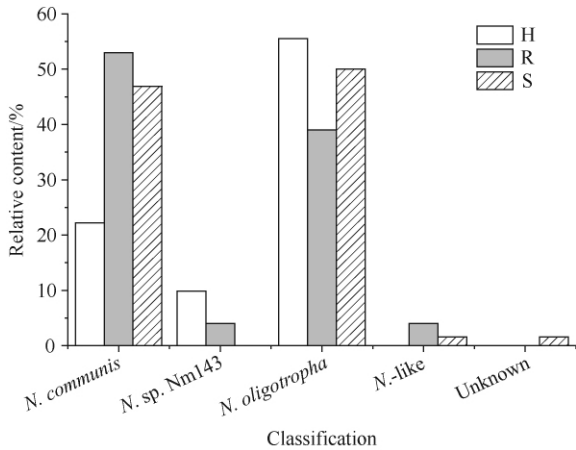


图 6. 基于系统发育树的氨氧化细菌群落结构组成

Figure 6. The community structure of ammonia oxidizing bacteria community based on phylogenetic tree.

3 讨论

3.1 氨氧化细菌群落多样性

通过对 16S rRNA 基因的分析发现在非海相生态环境中分离得到的氨氧化细菌有着单一的进化起源, 均来自变形菌 β -亚纲^[17]。到目前为止的研究结果也证实了这类细菌的系统发育分支包含了两个类群: 亚硝化螺菌属和亚硝化单胞菌属^[18]。本研究建立的 3 个克隆文库中的所有克隆子均来自于亚硝化单胞菌属, 未发现亚硝化螺菌属。Purkhold 等基于 16S rRNA 基因及 *amoA* 功能基因系统进化关系将氨氧化细菌中 *Nitrosomonas* 属分为 *Nitrosomonas communis*、*Nitrosomonas sp. Nm143*、*Nitrosomonas oligotropha*、*Nitrosomonas marina*、*Nitrosomonas europaea* / *Nitrosococcus mobilis* 5 个簇^[19]。本研究只检测到 *Nitrosomonas communis*、*Nitrosomonas sp. Nm143*、*Nitrosomonas oligotropha* 三个簇及 *Nitrosomonas-like*, 未发现 *Nitrosomonas marina* 和 *Nitrosomonas europaea* / *Nitrosococcus mobilis* 的存在。其中, 盐节木根际氨氧化细菌的优势群落为 *Nitrosomonas oligotropha*, 占克隆文库的 55.56%, 次优菌群为 *Nitrosomonas communis*; 芦苇根基氨氧化细菌的最优菌群为 *Nitrosomonas*

communis, 占克隆文库的 53%, 次优菌群为 *Nitrosomonas oligotropha*, 占克隆文库的 39%。盐角草根际氨氧化细菌的主要优势菌群为 *Nitrosomonas oligotropha*, 次优菌群为 *Nitrosomonas communis*, 分别占克隆文库的 50% 和 46.88%。综上所述, 艾比湖湿地三种植物根际氨氧化细菌的主要菌群为 *Nitrosomonas oligotropha* 和 *Nitrosomonas communis*。本研究还发现, 来自三种植物根际土壤的 *Nitrosomonas communis* 分支的克隆序列与来自内蒙古的高盐序列聚为一簇, 说明三种植物根际土壤中可能存在具有潜在嗜盐特性的氨氧化细菌。

3.2 理化因子对氨氧化细菌群落组成的影响

有研究表明, 盐度是 AOB 群落生境分异的一个重要驱动因子, 伴随着盐度梯度 AOB 的丰度和群落组成存在明显的不同, 这种不同体现在群落功能的差异上, 硝化速率通常在中等盐度条件下最高, 在较高或较低的盐度条件下, 硝化速率受到抑制^[20-21]。本研究发现, *Nitrosomonas oligotropha* 在三个文库中所占比例为盐节木 > 盐角草 > 芦苇, 而三种植物根际土壤的盐度大小分别为 9.10、2.67 和 4.37 ms/cm, 同样为盐节木 > 盐角草 > 芦苇。Coci 等在研究盐度对河水沉积物中 AOB 种群影响时发现, 经淡水灌溉后, *Nitrosomonas oligotropha* lineage 被同一 lineage 的其他 AOB 替代, 经盐水灌溉后, 表层内 1 cm 的 *Nitrosomonas oligotropha* 被 *Nitrosomonas marina* 所替代, 说明其对盐敏感^[22]。综上可知, 盐度是影响 *Nitrosomonas oligotropha* 群落的重要指标。除盐度之外, 氨浓度、氧浓度以及亚硝酸的含量对这一类群的氨氧化细菌也有影响。因此, 理化因子对于这一类群的影响还需要进一步的研究, 来了解这一类群存在的意义^[23]。

研究表明 *Nitrosomonas communis* 有很强的生态多样性^[24], 广泛存在于污水处理厂、活性污泥、淡水河口沉积物、土壤等环境中^[25]。Koops 等提出 *Nitrosomonas communis* 比 *Nitrosomonas oligotropha* 能更好地适应高氨的环境^[18], 但本研究中随着氨浓度的增加, *Nitrosomonas oligotropha* 在文库中所占的比例增加, 而 *Nitrosomonas communis* 所占的比例反而减小。Limpiyakorn 等得出 *Nitrosomonas communis* 在缺氧和氧波动的环境

中占优势^[24], 但是 Park 等指出溶解氧的浓度不能影响 AOB 的群落组成, 只能影响 AOB 的活性^[27]。所以, Lydmark 总结, 目前并没有足够的证据证明氧浓度和 AOB 群落组成的关系^[26]。

本研究中的氨氧化细菌均为 *Nitrosomonas*, 三种植物根际氨氧化细菌的优势菌群各不相同, 且未发现 *Nitrospira* 的群落出现。Koops, Purkhood 等研究发现亚硝化螺菌属主要出现在低铵的环境中^[18-19], Wang 等在研究不同施氮水平对稻田土壤氨氧化细菌的影响时发现, *Nitrosomonas* 所占比例随着含氧量的增加而逐渐增加, *Nitrospira* 随着施氮量的增加而减少^[28]。Beman 等发现 pH 是影响氨氧化细菌群落结构的重要因素之一, 亚硝化螺菌属大多出现在酸性和中性环境中, 碱性环境较少^[29]。我们的 3 个样品 pH 分别是 8.44、8.74 和 9.01, 均未检测到亚硝化螺菌属的出现, 证实了 Beman 等的观点。Chaparro 等研究表明, 根际分泌物与根际功能微生物群落组成有很强的相关性^[30-31]。

4 展望

目前研究表明, 具有氨氧化功能的微生物除氨氧化细菌外, 还发现氨氧化古菌的广泛分布, 并且其 *amoA* 基因的丰度高于氨氧化细菌的丰度^[30-36]。但是, Han 等发现南极土壤中氨氧化细菌 *amoA* 基因的丰度高于氨氧化古菌, 并推测这一现象可能与南极的极低温和寡营养环境有关^[21]。由于近年来对于注入艾比湖的河流进行节流的原因, 使得艾比湖的水位逐年下降, 艾比湖湿地的土壤含水量也在逐年降低; 经过理化性质的测定得知艾比湖湿地土壤较为贫瘠, 又因为艾比湖湿地独特的地理位置, 造成艾比湖湿地逐年的沙化、荒漠化。因此, 在以后的研究中可以通过定量的方法研究艾比湖湿地根际土壤中氨氧化细菌和氨氧化古菌的数量关系; 同时增加一些理化性质(如氧浓度)和根际分泌物对氨氧化微生物群落结构影响的研究。

致谢: 在野外采集样品过程中, 新疆艾比湖湿地国家级自然保护区管理局高翔局长和艾比湖湿地鸟岛管护站徐伟站长给予了大量的帮助, 在此一并表示衷心的感谢。

参考文献

- [1] Beman JM, Popp BN, Francis CA. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the gulf of California. *The ISME Journal*, 2008, 2 (4): 429-441.
- [2] Dong LH, Yang JS, Yuan HL. Research advances in molecular ecology of ammonia oxidizing bacteria. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19 (6): 1381-1388. (in Chinese)
董莲华, 杨金水, 袁红莉. 氨氧化细菌的分子生态学研究进展. *应用生态学报*, 2008, 19 (6): 1381-1388.
- [3] Jiao ZJ, Hong JH, Lin XG, Ralf C. Microbial ecology of archaeal ammonia oxidation—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (4): 431-437. (in Chinese)
贾仲君, 翁佳华, 林先贵, Ralf C. 氨氧化古菌的生态学研究进展. *微生物学报*, 2010, 50 (4): 431-437.
- [4] He JZ, Zhang LM. Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29 (1): 406-415. (in Chinese)
贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展. *生态学报*, 2009, 29 (1): 406-415.
- [5] Hao YJ, Wu SW, Wu WX, Chen YX. Research progress on the microbial ecology of aerobic ammonia-oxidizing bacteria. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27 (4): 1573-1582. (in Chinese)
郝永俊, 吴松维, 吴伟祥, 陈英旭. 好氧氨氧化菌的种群生态学研究进展. *生态学报*, 2007, 27 (4): 1573-1582.
- [6] Rotthauwe H, Witzel KP, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied Environmental Microbiology*, 1997, 63 (12): 4704-4712.
- [7] Hui LH, Zhao J, Wu LH, Shao YQ, Li JY, Zhu B. Community structure of ammonia-oxidizing prokaryotes at the dry-up lake in Huitengxile Grassland. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (1): 104-113. (in Chinese)
惠丽华, 赵吉, 武琳慧, 邵玉琴, 李靖宇, 朱兵. 辉腾锡勒草原干涸湖泊中氨氧化微生物群落结构分析. *微生物学报*, 2012, 52 (1): 104-113.
- [8] Wang SH, Wang XJ, Wang Q, Jin L. Responses of rhizosphere microorganisms to Arbuscular mycorrhizal fungi

- and their effects on host plants. *Acta Pratacul Turae Sinica*, 2007, 16 (3) :108-113. (in Chinese)
- 王树和, 王晓娟, 王茜, 金樑. 丛枝菌根及其宿主植物对根际微生物作用的响应. *草业学报*, 2007, 16 (3) :108-113.
- [9] Chai ZX, Li JH, Lou BG, Li W, Gan HL, Guo C, Zhao L, Dong D. Solation, identification, and sequence analysis of rDNA-ITS of *Pythium* species sampled from rhizosphere soil of corn. *Acta Pratacul Turae Sinica*, 2009, 18 (3) :126-135. (in Chinese)
- 柴兆祥, 李金花, 楼兵干, 李唯, 甘辉林, 郭成, 赵玲, 董迪. 玉米根围土壤中腐霉菌的分离鉴定及核糖体 DNA-ITS 序列分析. *草业学报*, 2009, 18 (3) : 126-135.
- [10] Hao DC, Chen SL, Xiao GP. Study of rhizosphere microbe based on molecular biology and genomics. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 36 (6) : 892-899. (in Chinese)
- 郝大程, 陈士林, 肖培根. 基于分子生物学和基因组学的植物根际微生物研究. *微生物学报*, 2009, 36 (6) :892-899.
- [11] Chen DW, Wang XG, Hu WG, Yang D, Lu LP, Dong YY. Correlation analysis between the distribution of ammonia-oxidizing bacteria and soil environment in Ebinur Lake Wetland. *Microbiology China*, 2012, 39 (3) :334-343. (in Chinese)
- 陈登稳, 王孝国, 胡文革, 杨迪, 路李鹏, 董艳艳. 艾比湖湿地氨氧化细菌数量空间分布及其与土壤环境相关性分析. *微生物通报*, 2012, 39 (3) :334-343.
- [12] Yang XD, Lv GH, Tian YH, Yang J, Zhang XM. Ecological groups of plants in Ebinur Lake Wetland nature reserve of Xinjiang. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28 (12) :2489-2494. (in Chinese)
- 杨晓东, 吕光辉, 田幼华, 杨军, 张雪梅. 新疆艾比湖湿地自然保护区植物的生态分组. *生态学杂志*, 2009, 28 (12) :2489-2494.
- [13] Xie H, Yu ET, Kong QY, Lv GH. Study on the halophytes in Aibi Lake Wetland nature reserve. *Journal of Arid Land Resources and Environment*, 2009, 23 (3) : 176-180. (in Chinese)
- 谢辉, 于恩涛, 孔琼英, 吕光辉. 艾比湖湿地盐生植物区系研究. *干旱区资源与环境*, 2009, 23 (3) : 176-180.
- [14] Yang J, Fu DP, Yang XD, Qin L, Lv GH. Study on the species diversity of typical plant communities in Ebinur Lake Wetland nature reserve. *Journal of Arid Land Resources and Environment*, 2010, 24 (2) : 145-149. (in Chinese)
- 杨军, 傅德平, 杨晓东, 秦璐, 吕光辉. 艾比湖湿地自然保护区典型群落物种多样性分析. *干旱区资源与环境*, 2010, 24 (2) :145-149.
- [15] Zhang HG, Wang HL. Quantitative classification and ordination of plant communities in Ebinur Lake Wetland nature reserve. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29 (16) :49-53. (in Chinese)
- 张辉国, 王合玲. 艾比湖湿地自然保护区植物群落数量分类研究. *中国农学通报*, 2013, 29 (16) : 49-53.
- [16] Lu RK. Analysis methods of soil agricultural chemistry. Beijing: Chinese Agricultural Science Press, 2000.
- [17] Purkhold U, Pommerening-Roser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops HP, Wagner M. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied Environmental Microbiology*, 2000, 66 (12) :5368-5382.
- [18] Koops HP, Pommerening-Roser A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 37 (2) :1-9.
- [19] Purkhold U, Wagner M, Timmermann G, Pommerening-Roser A, Koops HP. 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: Extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitro-somonads. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53 (5) :1485-1494.
- [20] Bernhard AE, Tucker J, Giblin AE, Stahl DA. Functionally distinct communities of ammonia-oxidizing bacteria along an estuarine salinity gradient. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (6) :1439-1447.
- [21] Han J, Jung J, Park M, Hyun S, Park W. Short-term effect of elevated temperature on the abundance and diversity of bacterial and archaeal *amoA* genes in antarctic soils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 23 (9) :1187-1196.
- [22] Coci M, Riechmann D, Bodelier PL, Stefani S, Zwart G, Laanbroek HJ. Effect of salinity on temporal and spatial dynamics of ammonia-oxidizing bacteria from intertidal

- freshwater sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 53 (3) :359-368.
- [23] Murdoch RW, Staniec AC. Diversity and community analysis of ammonia oxidizing bacteria in a streambed surrounding an artificial dam. *Journal of Environmental Management*, 2013, 127: 237-243.
- [24] Limpiyakorn T, Shinohara Y, Kurisu F, Yagi O. Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 54 (2) :205-217.
- [25] Qiu S, Chen G, Zhou Y. Abundance and diversity of ammonia-oxidizing bacteria in relation to ammonium in a Chinese shallow eutrophic urban lake. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2010, 41 (1) : 218-226.
- [26] Limpiyakorn T, Kurisu F, Sakamoto Y, Yagi O. Effects of ammonium and nitrite on communities and populations of ammonia-oxidizing bacteria in laboratory-scale continuous-flow reactors. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 60 (3) :501-512.
- [27] Park JJ, Byun IG, Yu JC, Park SR, Ju DJ, Hur SH, Park TJ. Analysis of nitrifying bacterial communities in aerobic biofilm reactors with different conditions using molecular techniques. *Water Science and Technology*, 2008, 57 (12) :1889-1899.
- [28] Wang Y, Ke X, Wu L, Lu Y. 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.
- [29] Beman JM, Roberts KJ, Wegley L, Rohwer F, Francis CA. Distribution and diversity of archaeal ammonia monooxygenase genes associated with corals. *Applied Environmental Microbiology*, 2007, 73 (17) :5642-5647.
- [30] Chaparro JM, Badri DV, Bakker MG, Sugiyama A, Mante DK, Vivanco JM. Root exudation of phytochemicals in Arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and co-relate with soil microbial functions. *PLoS One*, 2013, 8 (8) . doi:10.
- [31] Chaparro JM, Badri DV, Vivanco JM. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The ISME Journal*, 2014, 8 (4) :790-803.
- [32] Caffrey JM, Bano N, Kalanetra K, Hollibaugh JT. Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *The ISME Journal*, 2007, 1 (7) : 660-602.
- [33] Hatzenpichler R, Lebedeva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105 (6) :2134-2139.
- [34] Jung J, Yeom J, Kim J, Han J, Lim HS, Park H, Hyun S, Park W. Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils. *Research in Microbiology*, 2011, 162 (10) :1018-1026.
- [35] Jung J, Choi S, Jung H, Scow KM, Park W. Primers for amplification of nitrous oxide reductase genes associated with firmicutes and bacteroidetes in organic-compound-rich soils. *Research in Microbiology*, 2013, 159 (2) :307-315.
- [36] Leininger S, Urlich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442 (7104) : 806-809.

Community diversity of ammonia-oxidizing bacteria of three plants rhizosphere in Ebinur Lake wetland

Cuihua Wang, Fei Wu, Wenge Hu^{*}, Chao Mo, Xiaohong Zhang

College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] In order to study the community diversity of rhizosphere soil ammonia-oxidizing bacteria, *Haloctenium strobilaceum*, *Reed* and *Salicornia* in Ebinur Lake Wetland were investigated. [Methods] The clone libraries of *amoA* gene were constructed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and phylogenetics were analyzed. To explore the community structure of rhizosphere ammonia-oxidizing bacteria, we combined rhizosphere physicochemical factors of the three plants. [Results] Phylogenetic analysis of the *amoA* gene fragments showed that all of AOB sequences from shrimp of three plants rhizosphere were affiliated with *Nitrosomonas* or *Nitrosomonas-like* phyla, *Nitrospira* phyla was not discovered. Three plants rhizosphere composition includes 9 OTUs, 12 OTUs and 7 OTUs respectively. Coverages of all libraries of the three plants rhizosphere were over 99% and strongly representative. The richness index, *chao1* index, ACE index and Shannon index of the three libraries were as follows, *Reed* rhizosphere AOB was much higher than *Haloctenium strobilaceum* rhizosphere AOB, and *Salicornia* rhizosphere AOB was the lowest. [Conclusion] This study provides a basis for understanding the community diversity and structure of rhizosphere soil ammonia-oxidizing bacteria in Ebinur Lake wetland.

Keywords: rhizosphere, ammonia-oxidizing bacteria (AOB), *amoA* gene, PCR-RFLP analysis, clone library

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31160026) and by the High level Talents Starting Funds for Special Project of Shihezi University (RCZX201010)

^{*} Corresponding author. E-mail: hwg-t@163.com

Received: 22 December 2014/Revised: 31 January 2015