

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(6):780-787; 4 June 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

褐煤腐植酸对土壤氨氧化古菌群落结构的影响

董莲华^{1,2}, 李宝珍¹, 袁红莉^{1*}, Kate M Scow³

(¹ 农业生物技术国家重点实验室, 中国农业大学生物学院, 北京 100193)

(² 中国计量科学研究院, 北京 100013)

(³ 美国加州大学戴维斯分校土壤大气水资源实验室, 美国加利福尼亚 95616)

摘要:【目的】研究腐植酸(HA)对土壤氨氧化古菌(AOA)的影响,进而探讨HA对土壤氮循环的作用。【方法】采用末端标记限制性多态性分析(T-RFLP)和实时定量PCR技术,研究了两种腐植酸(原生腐植酸-cHA和降解后的腐植酸-bHA)与尿素一同施加于土壤中的氨氧化古菌(AOA)和古菌的群落结构及数量的变化。【结果】只加尿素的处理AOA数量明显增加,其群落结构也发生明显变化,而加入尿素和两种腐植酸(HA)的处理土壤中,AOA数量增加得到明显的抑制,且典范对应分析(canonical correspondence analysis,CCA)表明尿素是影响AOA群落结构的最大因素,而HA可以缓冲尿素对AOA群落结构的影响,从而可以稳定AOA的群落结构。只加入尿素的处理还导致了古菌数量降低,而两种HA均抑制古菌数量的降低,表明HA可以缓冲尿素对古菌的影响。CCA分析表明时间是影响古菌群落结构的最重要因素,将时间作为共变量的部分典范对应分析(partial canonical correspondence analysis,pCCA)表明除时间外古菌的群落结构对cHA也比较敏感。【结论】这些结果表明HA通过抑制AOA数量而调控其与植物竞争氨来减少氨的损失,从而提高尿素利用率。

关键词: 腐植酸(HA); 氨氧化古菌(AOA); 典范对应分析(CCA); 部分典范对应分析(pCCA)

中图分类号: O938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2010)06-0780-08

腐植酸(humic acid, HA)广泛存在于土壤、咸淡水域和煤炭物质中,是由动植物残体(主要是植物残体)在复杂的地质条件下,经过化学、生物分解及合成反应而形成的一类有机物质^[1-2]。由于HA能够影响氮素的转化,硝化作用又是全球氮循环中非常关键的一个环节,因此可以通过HA对进行硝化作用的微生物的直接或间接的影响来进一步揭示HA对氮循环的作用。硝化作用包括两个转化过程,第一步:将氨氧化成亚硝酸(NO_2^-),第二步是将亚硝酸氧化成硝酸(NO_3^-)。在整个氮素的转化过程中由氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌和(AOA)

完成第一步氧化过程,是生态系统中氮素循环的一个限速步骤,具有重大的全球效应^[3]。为了更好的理解生态与该系统中氨氧化菌之间的关系,进而保持生态系统的稳定性,研究环境因素对AOB和AOA的影响已经受到越来越多地关注。AOA是最近几年才发现的具有氨氧化能力的古菌^[4],而且AOA含有氨氧化细菌的关键酶—氨单加氧酶的全部亚基^[5-6],这些发现改变了人们对氨氧化菌仅局限在细菌界的传统观念。但目前对AOA的氨氧化机制以及环境因素对AOA的影响等方面研究仍有待进一步深入。

基金项目:国家“863计划”(2006AA10A213);国家自然科学基金项目(30670071)

* 通信作者。Tel: +86-10-62733349; E-mail: hlyuan@cau.edu.cn

作者简介:董莲华(1981-)女,博士,河北保定人,主要研究方向环境微生物。E-mail: lianhuadong@gmail.com

收稿日期:2009-12-31;修回日期:2010-04-03

另一方面,由于氮肥的大量使用造成的环境污染也成为一个亟待解决的问题。HA 应用于农业上能够提高氮肥(尿素)的利用率减少氮肥用量已被公认,因此每年有大量的 HA 复合肥用于农业。HA 提高尿素利用率的机理普遍认为是 HA 能够络合尿素,减缓其释放,本实验通过土壤中同时添加尿素和褐煤 HA,采用实时定量 PCR 和末端标记限制性片段长度多态性等技术来监测土壤中与氮循环相关的微生物—氨氧化菌的群落结构变化,目的是从微生物角度揭示 HA 提高尿素利用率的机理。在之前研究中发现 HA 能够稳定土壤细菌的群落结构,并且能抑制由尿素导致 AOB 数量的增加^[7]。本文主要研究 HA 对 AOA 和土壤古菌的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品:2006 年 4 月,取自中国农业大学温室研究基地,该土壤属于粘壤土^[8],取样深度为

0-10 cm。风干,过 1 mm 筛,备用。

1.1.2 腐植酸(HA)样品:cHA:采用化学法从天然褐煤中提取;bHA:用相同方法从微生物降解后的褐煤中提取。具体的方法见参考文献^[9]。

1.1.3 主要生化及化学试剂:DNA 提取试剂盒 Bio 101 FastDNA SPIN kit 购自 Bio 101, Inc. (CA, USA);质粒提取试剂盒 购自 Qiagen 公司;DNA 浓度检测试剂盒 Quant-iT dsDNA HS Assay kits 购自 Invitrogen 公司;TaqMan Universal PCR Master Mix 和 Power SYBR Green PCR Master Mix 均购自美国 ABI 公司;限制性内切酶 Hha I (GCG' C) 和 Msp I (C' CGG) 均购自 FBI 公司,dNTP 以及 PCR buffer, Taq、Ex 聚合酶购自 TaKaYa 公司。

1.1.4 特异性引物及探针:本试验所用引物均由上海生工和 Sigma 合成,其中 Arch-amoAF 和 Arch109F 的 5'端用荧光(FAM)标记,Arch-516P 5'端用 FAM 标记,3'端用 TAMRA 标记。具体序列见表 1。

表 1 引物名称及序列

Table 1 The PCR primers and probes for archaeal 16S rRNA and *amoA* genes

Primer or probe	Sequence(5'→3')	Target gene	Reference
Arch-amoAF	STAATGGTCTGGCTTAGACG	amoA (AOA)	[10]
Arch-amoAR	GCGGCCATCCATCTGTATGT	amoA (AOA)	
Arch-109F	ACKGCTCAGTAAGACCT	Arch 16S rRNA	[11]
Arch-934R	GTGCTGCCCGGCAATTCCCT	Arch 16S rRNA	
Arch-349F	GYGCASCAGKCGMG	Arch 16S rRNA	[12]
Arch-806R	GGACTACVSGGGTA	Arch 16S rRNA	
Arch-516P	FAM-TGYCAGCGCCGCGGTAAHACCVGC-TAMRA	Arch 16S rRNA	

1.2 微培养实验

本试验共设有 4 个处理(1) 尿素处理(Urea): 尿素浓度 1.0%;(2) Urea + cHA 处理: 尿素 1.0% + 0.1% cHA;(3) Urea + bHA 处理: 尿素 1.0% + 0.1% bHA;(4) 对照(Control): 不加任何外源物质的空白对照。每个处理(2 kg 土壤)设有 3 个重复,共 12 个容积为 5 L 的花盆。cHA 或 bHA 分别溶于 0.01 mol/L 的 NaOH 溶液中,用 HCl 调节 pH 7.0 加入土壤中。处理好的土样置于 28℃ 培养。第 1,3,4,5,7,9,12,16,28,84 天取样。

1.3 土壤 DNA 的提取与纯化

采用 FastDNA SPIN kit 提取试剂盒进行土壤基因组 DNA 提取;取 50-100 μL 的 DNA 粗提液,用柱式 DNA 纯化试剂盒按其步骤进行纯化。最后用 30 μL 无菌重蒸水溶解 DNA。

1.4 PCR 扩增

16S rRNA 和 AOA *amoA* 基因:PCR 扩增体系:引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, Buffer 2.5 μL, 酶

0.3 μL, DNA 模板(1 μg/L) 1 μL, dNTP(10 mmol/L) 0.5 μL, 用无菌水补足 25 μL。古菌 16S rRNA 扩增条件: 95℃ 5 min, 95℃ 40 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 min, 40 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min。AOA *amoA* 的扩增条件为: 95℃ 5 min, 95℃ 30 s, 55℃ 50 s, 72℃ 1 min, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min。

1.5 PCR 产物纯化、酶切及 T-RFLP

为了防止 PCR 扩增的偏好性,我们将每个样品按上述同样条件但每管扩增体系改成 50 μL 各扩增 3 管,共 150 μL 混合均匀后采用上海生工 UNIQ-10 柱式 PCR 产物回收试剂盒进行纯化,最后溶解到 50 μL 的无菌 ddH₂O 中,纯化后的 PCR 产物用于酶切。古菌 16S rRNA 目的条带采用 *Msp* I 进行酶切,酶切位点为 C'CGG; AOA *amoA* 目的条带采用 *Hha* I 进行酶切,酶切位点 GCG' C。酶切条件为 37℃, 3-4 h。酶切体系: 10 × Buffer 2 μL, 内切酶(10 U/μL) 0.4 μL (4 U), PCR 产物 4 μL, dd H₂O 补足 20 μL。

酶切产物用自动测序仪进行(选用 genescan 功

能)检测,末端带荧光标记的片段能被检测到,而其它没有带荧光标记的片段则检测不到。选择 TRF 的原则一般是:峰高 > 80 ^[13]。由 GENEMARKER 软件输出 TRF 结果,经过在线 (<http://inismor.ucd.ie/~talign/>) 软件-Align 处理得到一系列标准化了的 TRF 及对应的峰面积结果,对数据分别进行 CCA (canonical correspondence analysis) 分析。

1.6 实时定量 PCR

对古菌的 16S rRNA 基因采用 TaqMan 探针法定量。实时定量 PCR 体系: TaqMan Master Mix 10 μ L, 引物 arch345F 和 arch806R (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L, 模板 (1 μ g/L) 5 μ L, 无菌 ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 条件: 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 然后 40 个循环 95 $^{\circ}$ C 25 s, 59 $^{\circ}$ C 6 min。

对 AOA *amoA* 基因采用 SYBR green 实时定量 PCR 进行定量。AOA *amoA* 定量体系: 引物 Arch-amoAF 和 Arch-amoAR (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, Power SYBR Green Master Mix 10 μ L, 模板 (1 μ g/L) 5 μ L, 用无菌 ddH₂O 补足至 20 μ L。PCR 条件: 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 接着 40 个循环包括 95 $^{\circ}$ C 15 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min。

1.7 标准曲线的制备

采用引物 Arch345F/ Arch806R 对古菌的 16S rRNA 基因片断进行扩增, 然后将扩增产物连接到 TOPO TA 质粒上, 转化大肠杆菌, 提取质粒, 用 Qubit 荧光计和 Quant-iT 双链 DNA 定量检测试剂盒进行定量, 根据如下公式, 由已经序列长度及浓度推算出其拷贝数 (公式如下)。将 DNA 溶液从 10^9 至 10^2 依次进行 10 倍梯度稀释作为模板进行 PCR 扩增, 然后以拷贝数的对数为横坐标, C_T 值为纵坐标作图。AOA *amoA* 标准曲线的制备: 采用引物 Arch-amoAF 和 Arch-amoAR 扩增土壤总 DNA 中古菌的 *amoA* 基因, 然后将扩增产物连接到 pCR4 (4.6 bp) TOPO 载体上, 转化大肠杆菌, 以 10 倍梯度稀释的标准溶液所含的 *amoA* 拷贝数 ($10^7 - 10^2$) 的对数为横坐标, 以相对应的 C_T 为纵坐标作图, 得到一直线 (图略), 标准方程为 $y = -3.46x + 39.38$ ($R^2 = 0.99$)。

Avogadro (阿佛加德罗常数): 6.02×10^{23}

$$\text{copy\#} = \frac{(\text{Avogadro s\#}) ([\text{DNA}]g \cdot L^{-1})}{(MW_{\text{plasmid}} + MW_{\text{insert}})}$$

1.8 统计分析

应用生态统计分析软件 CANOCO (Microcomputer Power, Ithaca, N. Y.) 对微生物群落结构进行

CCA (canonical correspondence analysis) 和 pCCA (partial CCA) 分析^[14-15]。CCA 用来分析群落结构特点与环境因素的关系, 应用 SigmaStat 的 one way analysis of variance comparison^[16] 分析来比较各个处理之间的差异显著性。

2 结果

2.1 HA 对土壤氨氧化古菌 (AOA) 数量的影响

HA 对 AOA 数量的影响: 假定每个 AOA 细胞内含有一个 *amoA* 拷贝^[17], 计算得出 AOA 的细胞数量。由图 1 可知在培养后的第一周, 各处理的 AOA 数量略有上升, 对照和加入 HA 的处理增加不显著, 而尿素处理 (Urea) 则由最初的 $1.73 (\pm 0.81) \times 10^5$ 拷贝/克干土增加到 $5.22 (\pm 0.57) \times 10^5$ 拷贝/克干土 ($P < 0.05$)。培养后第四周, Urea 处理的 AOA 数量 ($1.04 (\pm 0.31) \times 10^6$) 与培养初期相比, 增加了 6 倍。其他处理没有明显变化。培养 12 周后, Urea 处理中 AOA 数量明显下降至 $5.2 (\pm 0.48) \times 10^4$ 拷贝/克干土 ($P < 0.05$); 而在 Urea + HAs 处理中, AOA 则有所上升, 但未达到统计显著性差异 ($P = 0.08$)。

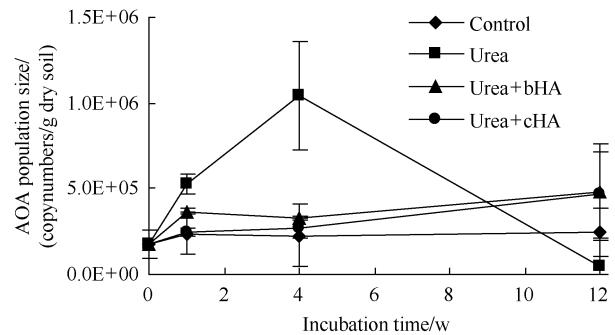


图 1 尿素及腐植酸对土壤 AOA 数量的影响

Fig. 1 Effects of urea and humic acid on soil AOA numbers.

2.2 HA 对 AOA 群落结构变化的影响

使用氨氧化古菌通用引物 Arch-amoA-F 和 Arch-amoA-R, 依照 1.4 中的方法分别进行 *amoA* 基因的 PCR 扩增。扩增产物 3 μ L (阴性对照上样 5 μ L) 进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。整个操作过程设置不加模板的反应体系作为阴性对照, 以得到的克隆子作为阳性对照。本实验中阴性对照上样 5 μ L 进行电泳时, 没有任何条带, 表明整个 PCR 操作过程中, 没有外源 DNA 的污染。AOA *amoA* PCR 扩增产物片段大小均为 635 bp, 经过纯化后的条带没有弥散和任何杂带, 可以直接用于下一步的酶切反应。

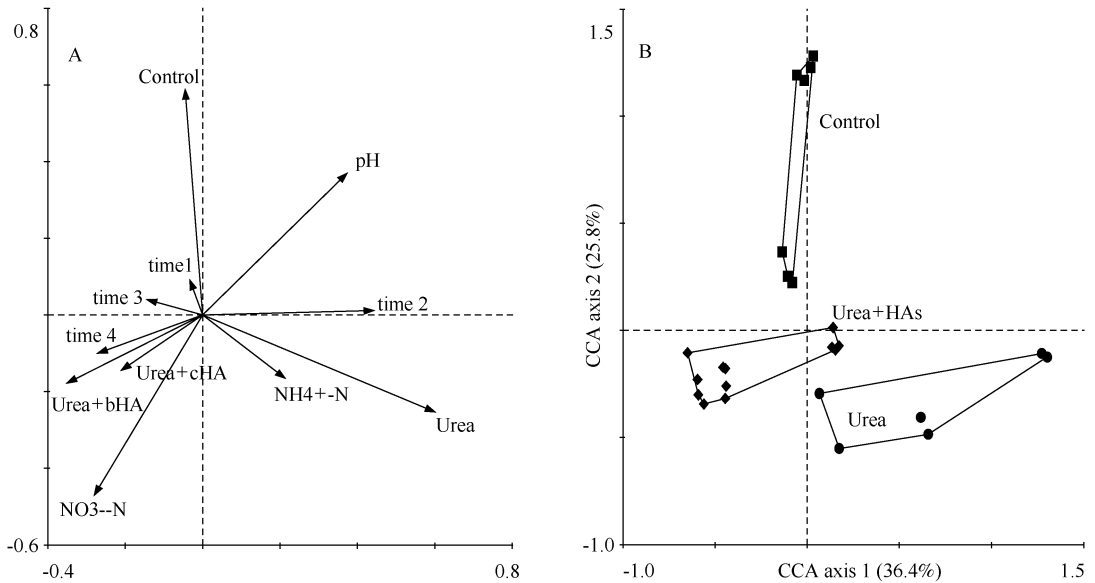


图2 Msp I 酶切产物 T-RFLP 结果的 CCA 分析 (A) 环境因素分布图 (B) 样品分布图

Fig. 2 Environmental variable (A) and samples (B) ordination plots of CCA results for TRFLP fingerprint digested by Msp I.

●—Urea; ■—Control; ◆—Urea + HAs.

尿素和 HA 对 AOA 群落结构影响: 因 *amoA* 基因可以作为系统发育的分子标识^[18], 从而对 AOA 进行群落结构分析。将 AOA 的 T-RFLP 结果进行 CCA 分析(图 2), 第一个轴可以解释 36.4%, 前两个轴一共可以解释 64.2% 的总变量。尿素是影响最大的环境变量, 其次是硝态氮和 pH(图 2-A)。pH 的升高和硝态氮浓度成反比, 表明硝态氮积累可以导致土壤 pH 降低。不同的处理(Urea, Urea +

HAs, Control) 被分成了三组 Control、Urea 和 Urea + HAs, Urea + HAs 介于对照(Control) 和尿素(Urea) 处理之间(图 2-B), 表明加入尿素会对 AOA 群落结构产生明显影响, 而同时加入 HAs, 则可以缓和这种作用, 使其群落结构变化不明显。另外 cHA 和 bHA 没有被分开 ($P = 0.56$), 说明两种 HA 对加入尿素后 AOA 群落结构变化的作用没有明显差别。

由于时间不是我们所关注的变量, 所以把时间

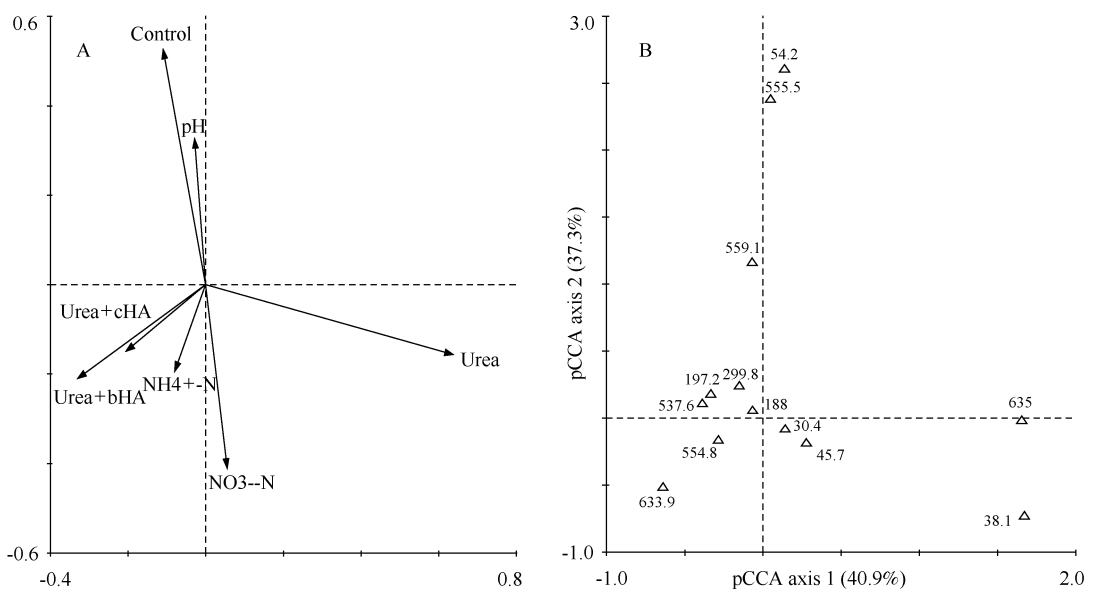


图3 Msp I 酶切产物 T-RFLP 结果的 pCCA 分析 (A) 环境因素分布图 (B) TRF 分布图

Fig. 3 Environmental variables (A) and species (B) ordination plots of pCCA results for TRFLP Fingerprint digested by Msp I.

Time was a covariable. Δ Species.

作为共变量,进行 pCCA 分析,结果如图 3。pCCA 环境因素分布图(图 3-A)的分析结果表明主要的影响因素除了尿素之外,其次是 NO_3^- 的浓度和 pH,且 NO_3^- 的浓度和 pH 负相关,这与上述 CCA 分析结果一致,表明时间对群落结构影响并不显著,但不同的是前两个轴可以解释总变量的 78.3%。图 3-B 为 AOA TRF 分布图。结合图 3-A 和 3-B,可以发现 TRF 54.2、555.5 和 559.1 bp 分布在高 pH 低 NO_3^- 浓度区,而 TRF38.1 和 633.9 bp 则分布在低 pH 高 NO_3^- 浓度区。另外 TRF38.1 和 635 bp 在尿素处理中分布广泛。而 TRF554.8 和 633.9 bp 在 Urea + HAs 处理中分布广泛。

2.3 HA 对古菌数量的影响

以 10 倍梯度稀释的标准溶液 ($10^2 - 10^7$) 所含的 16S rRNA 拷贝数的对数为横坐标,以相对应的 C_T 为纵坐标作图,得到一直线,其中 R^2 为 0.99,标准方程为 $y = -3.58x + 37.49$ 。

对于古菌,按照每个细胞内含有一个 16S rRNA 拷贝^[19],从而计算得到古菌的细胞数量。由图 4 可以看出只加尿素的处理在培养一周后,古菌数量明显下降 ($P < 0.05$)。Urea + HAs 处理与对照相比略有下降但没有达到显著差异 ($P = 0.08$),之后基本保持不变。而尿素处理中的古菌数量在培养四周后又有所回升,12 周后,各个处理的差异均不明显 ($P = 0.15$)。此结果表明尿素的施加会引起古菌数量的降低,而同时添加尿素和 HAs,则会对古菌数量

的变化起到稳定的作用。

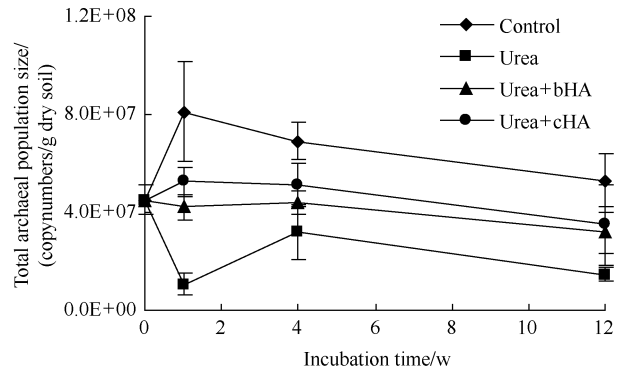


图 4 尿素和腐植酸对古菌数量的影响

Fig. 4 Effects of urea and humic acid on total archaea numbers.

CCA 及 pCCA 分析群落结构:对古菌的 T-RFLP 结果和相关环境因素进行 CCA 分析如图 5,由图可知时间是影响最大的因素 ($P = 0.002$),Time2 (即培养一周)的古菌群落结构与其他时间的相比,差异最为明显。因此样品被分成了两组,一组是培养一周的样品,其他样品无明显差异被聚到第二组。除时间外,pH 也是影响比较显著的因素。

由于 CCA 分析中时间影响其群落结构分布非常明显,从而掩盖了其他环境因素的影响趋势,所以我们将时间作为共变量进行 pCCA 分析,如图 6-A 为环境因素分布图,图 6-B 为样品分布图,图 6-C 为 TRF 分布图。由图 6-A 可以看出,cHA 是影响最大的因素 ($P = 0.02$),其次是 bHA 和氨浓度,而且

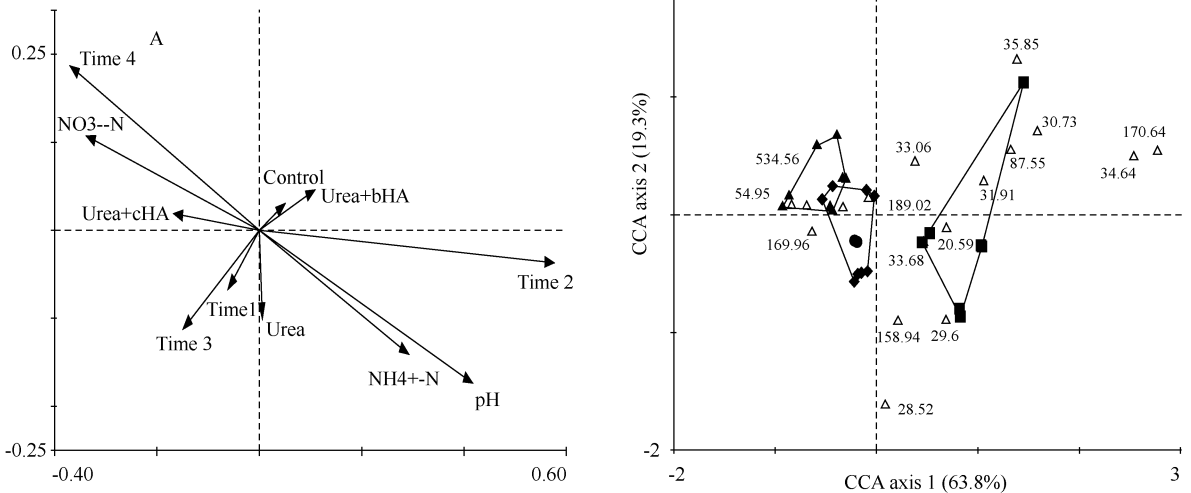


图 5 Hha I 酶切产物 T-RFLP 结果的 CCA 分析 (A) 环境因素分布图 (B) 样品与 TRFs 分布图

Fig. 5 Environmental variables (A) and samples with species (B) ordination plots of CCA results for T-RFLP fingerprint digested by Hha I. The analysis included all variables before pCCA. Δ Species; \bullet —Time 1; \blacksquare —Time 2; \blacklozenge —Time 3; \blacktriangle —Time 4.

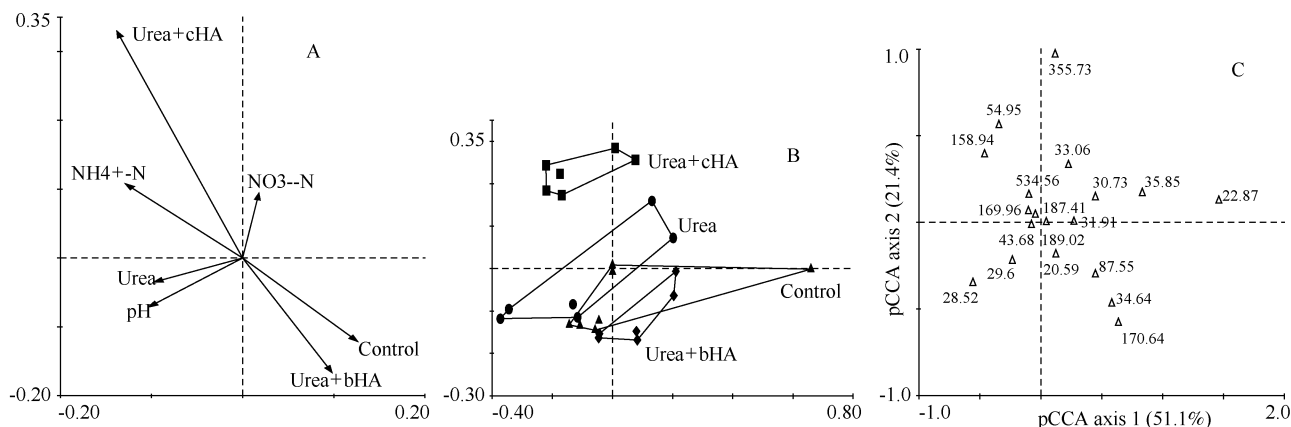


图 6 Hha I 酶切产物 T-RFLP 结果的 pCCA 分析 (A) 环境因素分布图 (B) 样品与 (C) TRFs 分布图

Fig. 6 Environmental variables (A), sample (B) and species (C) ordination plots of pCCA results for TRFLP fingerprint digested by Hha I. Time was a covariable. Δ Species; \bullet Urea; \blacksquare Urea + cHA; \blacklozenge Urea + bHA; \blacktriangle Control.

cHA 和 bHA 两者负相关。图 6B 显示所有样品被分成了三组,第一组为 Urea + cHA,第二组为 Urea 处理,第三组为 Urea + bHA 和 Control,因此 cHA 对其群落结构的影响最为显著,对照组 Control 与 Urea 和 Urea + bHA 之间差异并不显著,但是 Urea 和 Urea + bHA 之间差异显著。TRF20.59, 34.64, 87.55 和 170.64 bp 在 Urea + bHA 和对照中分布广泛,而 TRF28.52 和 29.6 bp 则在尿素处理中分布广泛。TRF54.95, 158.94 和 355.73 bp 在 Urea + cHA 中广泛分布。

3 讨论

据报道土壤中施加氮肥可以增加氨氧化细菌的数量和硝化活性^[20],在我们施加尿素的处理中的确检测了 AOB 和 AOA 数量的增加,而且反映硝化活性的硝化势也明显增加^[7],而加入 HA 后, AOA 和 AOB 的数量增加均得到了抑制,推测其机理为:(1) HA 通过抑制脲酶活性抑制尿素转化成氨的速度^[7],控制了氨在土壤中的可获得性,从而在一定程度上可以抑制以氨为底物的 AOA 和 AOB 的增加;(2) HA 作为一类复杂的有机大分子可以络合尿素和氨,使得土壤中氨的浓度在一定时间内维持在一个稳定的水平,从而使得 AOA 和 AOB 数量保持相对稳定。第一种推测根据我们在实验过程中测定的脲酶活性和氨浓度已经得到证实。第二种推测需要实验来进一步证实。

加入尿素导致 AOA 数量明显增加,而 HA 的加入明显抑制了 AOA 数量的增加,这些变化与我们先前发现的 AOB 数量变化^[7]相比有较显著差异:1) 施加尿素后,土壤中 AOB 数量增加比 AOA 迅速(处

理后第一周 AOB 达到最高,而 AOA 则在第四周达到最高);2) 对照基本保持一定范围不变,但与 Urea + HAs 处理差别显著:AOB 在培养后 1、4 周数量均增加,且与对照相比达到差异显著,而 Urea + HAs 处理中 AOA 数量则未达到与对照差异显著。这表明尿素可以明显增加 AOA 和 AOB 的数量,而加入 bHA 和 cHA 后, AOA 数量的增加与 AOB 相比得到了更为明显的抑制。抑制以氨为底物的 AOA 和 AOB 的数量增加,可以在一定程度上降低氨氧化菌与植物竞争氨,减少氨的损失,提高尿素利用率。同时也阻止了部分氨转化成硝酸,降低了对环境的污染。

加入尿素处理中 AOA 数量明显增加,而总古菌数量则明显下降,这表明尿素的加入突出的选择了 AOA,而其它的古菌明显的得到了抑制,从对照处理中的 AOA 和古菌数量维持不变可以证明该推测。这些结果与尿素对 AOB 和总细菌的影响相似,加入尿素导致 AOB 数量增加的同时却使得细菌数量降低,微生物多样性明显降低,我们推测其原因是因为 AOB 和 AOA 仅占总细菌和古菌的 0.1% 左右,所以 AOA 或 AOB 数量的增加并不能掩盖尿素对其他微生物的抑制作用从而整体细菌和古菌表现为数量下降,微生物多样性降低。

Leininger 等^[17]报道多数土壤中氨氧化古菌的数量多于氨氧化细菌的数量,而在我们的同一批次供试土壤中发现 AOB 数量占优势,为此我们经过 3 次重复实验,但均得到了类似结果,因此我们推测不同地区、不同类型的土壤中 AOA 和 AOB 数量存在较大差别。

土壤中加入尿素后会明显降低古菌的数量,而 HA 的加入可以稳定古菌数量,HA 对古菌数量的影

响与对细菌的影响一致^[7],推测其原因是 HA 的加入能够缓冲土壤的 pH,而 pH 是稳定土壤微生物群落结构一个很重要的因素^[21],我们在实验中对 pH 的监测结果也证实这一推测^[7]。另外,CCA 和 pCCA 分析结果均表明 HA 可以稳定 AOA、AOB 和细菌的群落结构变化,而稳定的土壤微生物群落组成是维持土壤生态系统平衡以及土壤肥力的一个重要指标,因此 HA 对于农田生态系统、提高尿素利用率、减少氨的损失以及环境保护均有重要意义。

参考文献

- [1] Zech WN, Senesi G, Guggenberger K. Factors controlling humifraction and mineralization of soil organic matter in the Tropics. *Geoderma*, 1997, 117: 117-161.
- [2] Stevenson FJ. Humus chemistry, New York: John Wiley & Sons, 1994.
- [3] Oved T, Shaviv A, Goldrath T. Influence of effluent Irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 3426-3433.
- [4] Ko"nneke M, Bernhard AE, De la Torre JR., Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437: 543-546.
- [5] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen L, Nelson KE, Nelson W. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, 304(5667): 66-74.
- [6] Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, Klenk HP, Schleper C. Novel genes for nitrite reductase and amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 2005, 7: 1985-1995.
- [7] Dong L, Córdova-Kreylosb AL, Yang J, Yuan H, Scow KM. Humic acids buffer the effects of urea on soil ammonia oxidizers and potential nitrification. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41: 1612-1621.
- [8] 熊毅, 李庆逵. 中国土壤. 北京: 科学出版社, 1987.
- [9] Dong L, Yuan Q, Yuan H. Changes of chemical properties of humic acids from crude and fungal transformed lignite. *Fuel*, 2006, 85: 2402-2407.
- [10] Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2005, 102(41): 14683-14688.
- [11] Grosskopf R, Janssen PH, Liesack W. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64(3): 960-969.
- [12] Takai K, Horikoshi K. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using pluoerogenic probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (11): 5066-5072.
- [13] Blackwood CB, Marsh TL, Kim SH, Kim SH, Paul EA. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, . 69: 926-932.
- [14] Leps J, Milauer PS. Multivariate analysis of ecological data using CANOCO. Cambridge: University Press. 2003
- [15] Cordova-Kreylos AL, Cao Y, Green GP, Hwang HM, Kuivila KM, Montagne MG, Werfhorst LCVD, Holden PA, Scow KM. Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California salt marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 3357-3366.
- [16] Foster J, Ganatra M, Kamal I. The Wolbachia genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *Plos Biology*, 2005, 3 (4): 599-614.
- [17] Leininger S, Urich 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.
- [18] Stephanie A. Boyle-Yarwood, Peter J, Myrold DD. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils under stands of red alder and Douglas fir in Oregon. *Environmental Microbiology*, 2008, 1:1-9.
- [19] Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR, Schmidt TM. Rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29: 181-184.
- [20] Okano, Y, Hristova, KR, Leutenegger, CM, Jackson LE, Denison RF, Gebreyesus B, Lebauer D, Scow KM. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 1008-1016.
- [21] Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2006, 103: 626-631.

Effect of lignite humic acid on soil ammonia oxidizing archaea community

Lianhua Dong^{1,2}, Baozhen Li¹, Hongli Yuan^{1*}, Kate M. Scow³

(¹State Key Lab for Agro-biotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

(²National Institute of Metrology, Beijing 100013, China)

(³Department of Land, Air and Water Resources, University of California, Davis, California 95616-5200 USA)

Abstract: [**Objective**] To illuminate the impact of humic acid (HA) on soil ammonia oxidizing archaea and then reveal the effect of HA on soil nitrogen cycle. [**Methods**] Two humic acids (cHA and bHA) were added into the soil amended with urea. Community changes of ammonia oxidizing archaea (AOA) and total archaea were studied with terminal restricted fragment length polymorphism (T-RFLP) and real time PCR in the microcosm experiment. [**Results**] We found that the AOA population size increased significantly and AOA community changed greatly in the urea only treatment. However, HA could inhibit the increase of AOA population, moreover, HA could buffer the change in AOA community showed by canonical correspondence analysis (CCA) result. On the other hand, the total archaeal population decreased significantly in the urea only treatment, but stabilized in the urea with HA treatments, which indicated HA could eliminate the toxicity of urea to total archaea. CCA results showed that incubation time was the most important factor for the total archaeal community, and partial CCA (pCCA, when time as a covariable) result demonstrated that cHA was the most important environmental variable for total archaeal community. [**Conclusion**] These results showed that HA diminished ammonia loss by inhibiting the increase of AOA competing with plant for ammonia, thus HA can increase the urea efficiency.

Keywords: humic acid (HA); ammonia oxidizing archaea (AOA); canonical correspondence analysis (CCA); partial canonical correspondence analysis (pCCA)

(本文责编: 张晓丽)