

辉腾锡勒草原干涸湖泊中氨氧化微生物群落结构分析

惠丽华¹, 赵吉^{2, 3*}, 武琳慧², 邵玉琴², 李靖宇¹, 朱兵¹

内蒙古大学,¹ 生命科学学院,² 环境与资源学院, 呼和浩特 010021

³中美生态能源及可持续性科学内蒙古研究中心, 呼和浩特 010021

摘要: 【目的】以内蒙古辉腾锡勒草原九十九泉湿地为对象, 研究湖泊干涸过程中氨氧化微生物的群落结构及其变化。【方法】通过 MPN-PCR 定量测定氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)的数量; 构建 *amoA* 基因克隆文库, 进行系统发育分析; 结合土壤环境因子, 探讨湿地退化过程中影响氨氧化微生物的潜在因素。【结果】依湖泊湿地退水梯度的不同样点中, 有 75% 的样点 AOB 的数量高于 AOA, AOB 与 AOA 的数量比率为 0.3-18.1。从湖心到湖岸草原带, AOA 和 AOB 的数量有明显增加, 但生物多样性呈降低趋势, 二者没有呈现正相关。研究发现, AOB 的数量与土壤中 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的变化存在良好响应。系统发育分析显示, 退化湖泊湿地 AOA 克隆序列均来自于泉古菌门(Crenarchaeota); AOB 的 *amoA* 基因的克隆序列大部分与亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)有一定同源性, 较少部分与亚硝化螺菌属(*Nitrospira*)有一定同源性。【结论】湖泊退水过程增加了湿地土壤氨氧化微生物的数量, 而氨氧化微生物的种群丰度有所降低。AOA 和 AOB 群落对湖泊湿地的退化过程做出了响应, 其中 AOB 的响应较为明显, 氧化条件和土壤铵浓度的改变可能是促成这种响应的重要原因。

关键词: 湖泊干涸, MPN-PCR, 氨氧化古菌, 氨氧化细菌, 生物多样性

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 01-0104-10

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。土壤微生物对环境变化敏感, 可早期指示生态系统功能的变化, 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^[1]。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, 典型的氨氧化过程被认为是主要由变形菌纲中

的一部分细菌类群进行的专性好氧的化能自养过程^[2]。Horz 等在 Jasper Ridge Global Change Experiment (JRGCE) 的研究中发现氨氧化细菌的群落结构和多样性对模拟的多因子全球变化有明显的响应^[3]。近年来, 越来越多的研究显示在原核生物组成中占重要比例的温泉古菌具有氨氧化能力, 这群独特的微生物迅速引起了人们的关注, 成为一个新的研究热点。Treich 等(2005)在对土壤泉古菌基因组分析时也发现泉古菌氨单加氧酶编码

基金项目: 国家“973 项目”前期研究专项(2009CB125909); 国家自然科学基金(31160129); 科技部“国家科技支持计划课题”(2011BAC02B03)

* 通信作者。Tel: +86-471-4991676; Fax: +86-471-4991436; E-mail: ndzj@imu.edu.cn

作者简介: 惠丽华(1984-)女, 内蒙古包头人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物研究。E-mail: huilihua-1984@163.com

收稿日期: 2011-07-19; 修回日期: 2011-11-14

(ammonia monooxygenase subunit A, *amoA*) 基因^[4]。许多研究结果均表明氨氧化微生物对陆地生态系统中环境因子的变化具有潜在的指示作用^[5]。

内蒙古高原自然湿地资源丰富,但也是目前最受威胁的环境系统,其中的草原区湖泊干涸趋势日趋明显。选择内蒙古高原有代表性的干涸湖泊湿地,以氮素循环中起关键作用的氨氧化微生物作为切入点,旨在认识湖泊湿地退化过程对氨氧化微生物数量和群落结构的影响,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 样品采集和实验材料

1.1.1 样点描述: 研究区域位于内蒙古中部的辉腾锡勒草原九十九泉湖泊湿地(41°06′28.1″E, 112°36′07.2″N),该湖泊近五年均已退水,完全干涸,湖泊当中湖坡最先退水,底部湖心最晚退水。辉腾锡勒草原是典型的高山草甸草原,海拔高度 2000 m - 2131 m,属典型的温带大陆型气候,冬季漫长而酷冷,夏季短促而凉爽。年平均气温为 -1.3℃,最低气温 -39.9℃,最高气温 28.2℃,年平均降水量 385 mm;无霜期 100 d;平均风速 8.8 m/s。土壤以栗钙土为主。植被覆盖率 80% - 95%,并确认 18 种禾草为珍稀草种。

1.1.2 样品采集和预处理: 从湖心底部到湖岸草原带依照退水顺序,依次选取 4 个采样点,分别是湖心、湖底、湖坡、湖岸(草原对照带),分别标记为 A、B、C、D。用 GPS 定位仪确定采样点的经纬度,对于每个点位进行“S”型采样^[6],分别取土壤的 0 - 10 cm 表层,4℃ 保鲜并迅速带回实验室进行每个样点土样的混匀,过 2 mm 筛,分装,保存于 -80℃ 和 4℃ 用于 DNA 提取和其他理化因子的分析。

1.1.3 主要仪器和试剂: Vortex-Genie® 2 (Mobio Laboratories Inc); Eppendorf PCR 仪(德国); HC-2062 高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。Axyprep DNA Gel Extraction Kit (Axygen

scientific, Inc USA); pEASY-T1 Cloning Kit (TransGen Biotech)。

1.2 土壤理化性质及微生物数量和生物量测定

稀释平板法测定好气性细菌(Aerobic bacteria)的数量,土壤微生物生物量碳(MBC)和微生物生物量氮(MBN)采用氯仿熏蒸法测定。土壤理化性质测定参考文献[7]。

1.3 土壤总 DNA 提取

采用玻璃珠-氯化钙-SDS 法提取土壤总 DNA^[8],每个样品称取约 0.3 g 土壤,提取的 DNA 溶解于 50 μL TE 中,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,紫外分光光度计测定 230、260、280 nm 的吸光度,用以检测 DNA 的提取效率及纯度。

1.4 MPN-PCR

MPN-PCR 方法是基于 MPN 计数方法^[9],利用分子手段对微生物进行计数的成熟方法,特别适合于测定土壤微生物中的特定生理群(如氨化、硝化、纤维素分解、固氮、硫化和反硫化等细菌)^[6]。

1.4.1 基于 *amoA* 基因的 PCR 扩增计数: 选择 AOA 和 AOB 的氨单加氧酶基因(*amoA*)作为目标基因。

AOA 的 50 μL 扩增体系包含 dNTPs (2.5 mmol/L) 8.0 μL、引物对 Arch-amoAF / Arch-amoAR^[10] (10 pmol/L) 各 1.0 μL、10 × Buffer (Mg +) 5.0 μL、EasyTaq DNA polymerase (TransGen Biotech 5 U/μL) 0.4 μL、模板 2 μL。PCR 反应条件:95℃ 1 min;95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 10 min。目标片段 635 bp。

AOB 的 50 μL 扩增体系包含 dNTPs (2.5 mmol/L) 4.0 μL、引物对 aomA-1F/amoA-2R^[11] (10 pmol/L) 各 1.0 μL、10 × Buffer (Mg +) 5.0 μL、EasyTaq DNA polymerase (TransGen Biotech 5 U/μL) 0.4 μL、模板 2 μL。PCR 反应条件:94℃ 1 min;94℃ 1 min,59℃ 1 min,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min。目标片段 491 bp。

1.4.2 MPN-PCR 结果计算: 将模板连续稀释,稀释浓度选择 10⁻¹ - 10⁻⁶,每个稀释度 3 个重复。每克干土中细菌数 (cell/g) 采用以下公式计算^[6]。

$$\text{细菌数} = \frac{\text{细菌近似值} \times \text{数量指标第一位数的稀释倍数} \times \text{DNA 样品体积}}{\text{模板体积} \times \text{沉积物样品质量(干重)}} \times \frac{1}{2.5^a}$$

a: Note that characterised AOB have 2 to 3 copies of the *amoA* gene per chromosome which accounts in sensitivity in this assay^[2]

1.4.3 PCR 扩增产物纯化回收:分别对 4 个土壤样品中 AOB 和 AOA 的 *amoA* 基因进行扩增,PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶检测,用 Axyprep DNA Gel Extraction Kit(Axygen scientific, Inc USA) 试剂盒进行 PCR 产物回收纯化。

1.5 构建克隆文库及系统进化分析

针对定量结果,选取 AOA 和 AOB 各自数量最多和最少的样点,构建 4 个 *amoA* 基因的克隆文库,以研究其数量与生物多样性的关系。每个文库中,随机挑取 28-30 个阳性克隆,分析其 *amoA* 基因序列,委托上海英骏公司完成测序工作。测序结果用 CLC sequence Viewer 5 软件编辑原始 *amoA* 基因序列,得到可信长度 635bp 和 491bp 的两种序列,用 BioEdit 软件生成距离矩阵文件,再将生成的距离矩阵文件用 DOTUR 软件分析克隆序列^[12],构建系统发育树时选取具有 98% 序列相似性的序列定义为一个 OTU (Operational taxonomic unit, 可分类操作单元)^[13]。对于每个文库选取 OTU 的同时,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)^[14],与 NCBI 网络数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行比对,选取相似度最高的序列为参照序列,与本研究所获

得的克隆序列相结合,经 ClustalW 软件生成 MEGA version 4.0 软件指定的文件输入格式,用 MEGA version 4.0 软件构建系统发育树^[15],距离系数选择 Kimura 双参数距离。

1.6 基因序列在 GenBank 中的登录号

测定的基因序列均已提交至 GenBank。AOA-A 登录号: JF735049 - JF735076; AOA-D 的登录号: JF735077 - JF735106; AOB-B 的登录号: JF734992 - JF735019; AOB-D 的登录号: JF735020 - JF735048。

2 结果和分析

2.1 干涸湖泊湿地土壤理化参数与生物量信息特征

湖泊湿地 4 个样点(A、B、C、D)依次是湖心-湖底-湖坡-湖岸草原,其湿地土壤的 pH 值、微生物生物量氮(BN)、全磷(TP)有明显的梯度变化;好气性细菌(Aerobic bacteria)数量、微生物生物量碳(MBC)、全氮(TN)、有机质(SOM)、铵态氮(NH₄⁺-N)总体呈上升趋势,但都在 B 或 C 样点出现拐点;同样,含水率(Soil moisture)和硝态氮(NO₃⁻-N)呈下降趋势,也都在 B 或 C 样点出现拐点,详见表 1。

表 1 样品的基本特征

Table 1 Basic characteristics of samples

Plots	pH	Soil moisture (%)	MBC (mg/Kg)	MBN (mg/Kg)	Aerobic bacteria (CFU /g)	TN (g/Kg)	TP (g/Kg)	SOM (g/Kg)	NO ₃ ⁻ -N (mg/Kg)	NH ₄ ⁺ -N (mg/Kg)
A	9.24	33.33	461.58	113.86	1.06E+07	11.56	0.90	114.84	7.54	1.18
B	9.40	21.26	387.77	120.18	8.30E+06	6.93	1.01	96.65	3.61	1.00
C	8.32	17.51	661.85	174.89	1.12E+07	7.35	1.04	84.74	1.94	1.12
D	7.63	20.95	897.79	204.48	1.20E+07	11.71	1.05	120.62	3.19	2.31

2.2 氨氧化微生物 MPN-PCR 计数结果

每个样品统计其各个稀释度的 3 个重复中出现阳性结果的个数,得到相应的数量指标。

2.2.1 氨氧化古菌(AOA):根据实验得到的阳性结果,按照 MPN 计数原则,确定氨氧化古菌在 A、B、C、D 样点的数量指标分别为 200, 320, 320, 300, 数量指标第一位的稀释倍数分别是 10、10、10、10²(见图 1)。

2.2.2 氨氧化细菌(AOB):同理,据实验阳性结果确定氨氧化细菌在 A、B、C、D 样点的数量指标分别是 320, 300, 312, 310, 数量指标第一位的稀释倍数分别是 10、10、10²、10³(图 2)。

2.3 氨氧化微生物的数量差异分析

根据以上结果得出的数量指标和数量指标第一位的稀释倍数,查 MPN 表,依据细菌数计算公式得出氨氧化微生物在各土壤中的细胞数量,通过与各样点中好气性细菌数量相比较,发现 AOB 的数量与其变化相一致,总体呈上升趋势,并且都在 B 样点处出现拐点,即相比较其他 3 个样点数量最少。AOA 的数量从湖心到湖岸草原依次增加(图 3)。

图 3 显示, AOA 在 A 样点中的数量是最少的,而 AOB 在 B 样点中的数量是最少的,在 D 样点中,古菌和细菌的数量都是最多的。并且在 4 个样点中 AOB 数量与 AOA 数量的比率为 0.3 (B 样

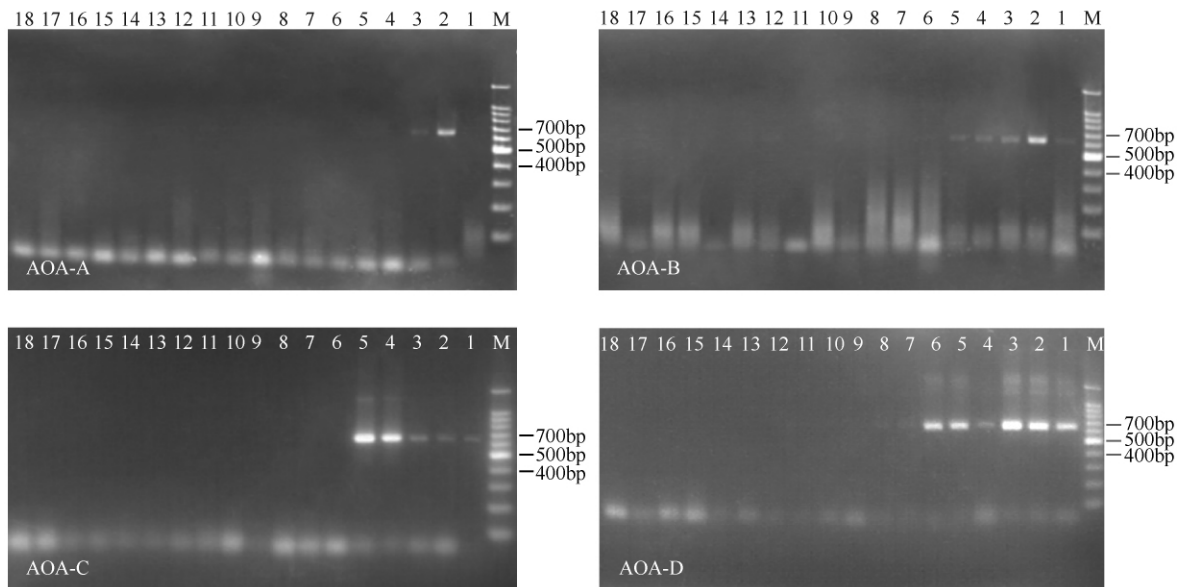


图 1 各样点氨氧化古菌的 MPN-PCR 结果

Fig.1 MPN-PCR of the AOA in four samples . the numbers in figure from 1 to 18, group of three according to order, represent three repetitions of one dilution respectively, total of six dilution, in order from right to left is 100bp DNA Ladder Marker, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .

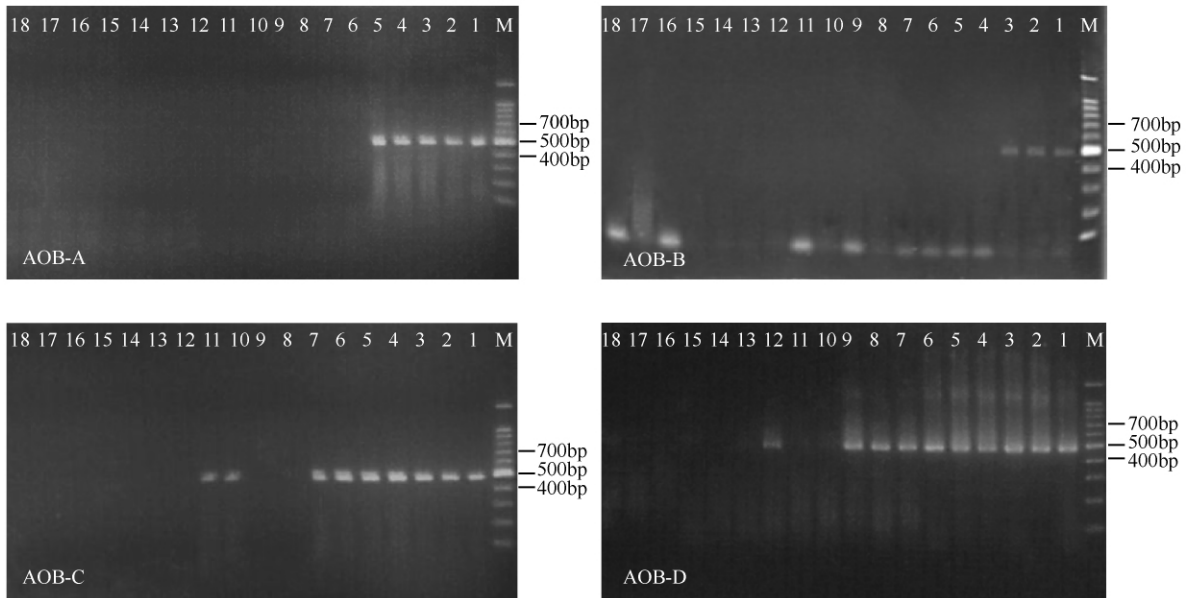


图 2 各样点氨氧化细菌的 MPN-PCR 结果

Fig.2 MPN-PCR of the AOB in four samples. the numbers in figure from 1 to 18, group of three according to order, represent three repetitions of one dilution respectively, total of six dilution, in order from right to left is 100bp DNA Ladder Marker, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .

点) -18.1 (D 样点), 在 75% 的样点中, AOB 的数量高于 AOA, 与 2009 年 Di 等人的研究较一致^[16], 他们的研究结果显示在氮源丰富的草原土壤中, 氨氧化细菌种群数量占优势, 并且硝化作用是由

细菌驱动而非古菌。另外 Leininger 等人曾研究了跨越欧洲 3 个气候带的 12 个样地中 AOB 和 AOA 数量和丰度, 研究发现所有样地中 AOA 的数量均高于 AOB^[17]。

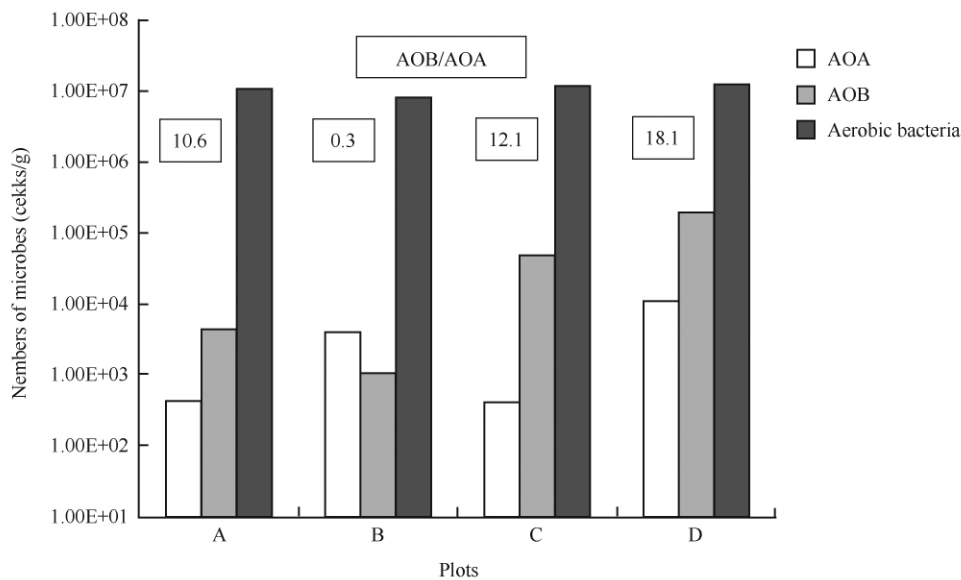


图3 微生物在各样点中的数量

Fig.3 Numbers of microbes in plots.

2.4 氨氧化细菌对土壤中 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的响应

4个样点中,B样点的全氮和 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 含量最低(表1),出现拐点,但没有影响 AOA 数量总体增加的趋势,之前也有研究显示 AOA 的数量和活性可以随着底物中低浓度氨的增加而增加^[13]。而 AOB 的数量在 B 样点处出现拐点,与 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的变化趋势相一致,表明 AOB 的数量对土壤中铵浓度的变化做出了响应。

2.5 干涸湖泊湿地土壤中 AOA 和 AOB 的群落结构及多样性分布

将以上定量出的 AOA 和 AOB 数量最少和最多

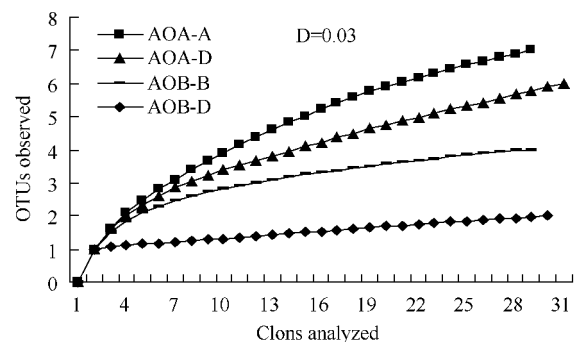


图4 各样点稀缺性曲线

Fig.4 Rarefaction curves of different samples.

表2 基于门水平和种水平的各样点克隆文库多样性指数

Table 2 Diversity indices based on phylum-level and species-level of clone libraries in samples

Source	AOA-A		AOA-D		AOB-B		AOB-D	
NO. of analyzed clones	28		30		28		29	
Distance ^a	0.03	0.2	0.03	0.2	0.03	0.2	0.03	0.2
Coverage% ^b	82	100	80	100	100	100	100	100
Richness ^c	7	1	6	1	4	3	2	1
Chao1 ^d	8.5	1	7.5	1	4	3	2	1
ACE ^e	9.46	0	12.56	0	5.03	4	0	0
1/Simpson ^f	2.64	1	2.49	1	2.16	1.26	1.07	1
Shannon ^g	1.33	0	1.17	0	0.94	0.41	0.15	0

^a80% identity was estimated as the phylum-level distance ($D=0.20$), and 97% identity was estimated as the species-level distance ($D=0.03$).

^bPercentage of coverage: percentage of observed number of OTUs divided by Chao1 estimate.

^cRichness is based on observed unique OTUs.

^dNonparametric statistical predictions of total richness of OTUs based on distribution of singletons and doubletons.

^eNonparametric statistical prediction of total richness of different OTUs based on distribution of abundant (410) and rare (p10) OTUs.

^fReciprocal of Simpson's diversity index. A higher number represents more diversity.

^gShannon diversity index. A higher number represents more diversity.

的样点分别标记为: AOA-A、AOA-D、AOB-B、AOB-D。依此构建 4 个 *amoA* 基因克隆文库, 共获得 115 个有效克隆序列, 其中 AOA-A、AOA-D、AOB-B、AOB-D 分别具有 28, 30, 28, 29 个 *amoA* 基因序列。计算克隆文库覆盖率显示所检测的克隆数代表了 80% - 100% ($D = 0.03$) 的克隆文库 (表 2), 各样点稀缺性曲线计算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微生物种群信息较好地代表了真实环境中的氨氧化微生物多样性。

选取了各样点门水平 ($D = 0.2$) 和种水平 ($D = 0.03$) 的多样性指数进行比较^[18], 表 2 显示, 在种的水平上 ($D = 0.03$), AOA 在 A 和 D 样点中分别具有 7 个和 6 个 OTUs, AOB 在 B 和 D 样点中分别有 4

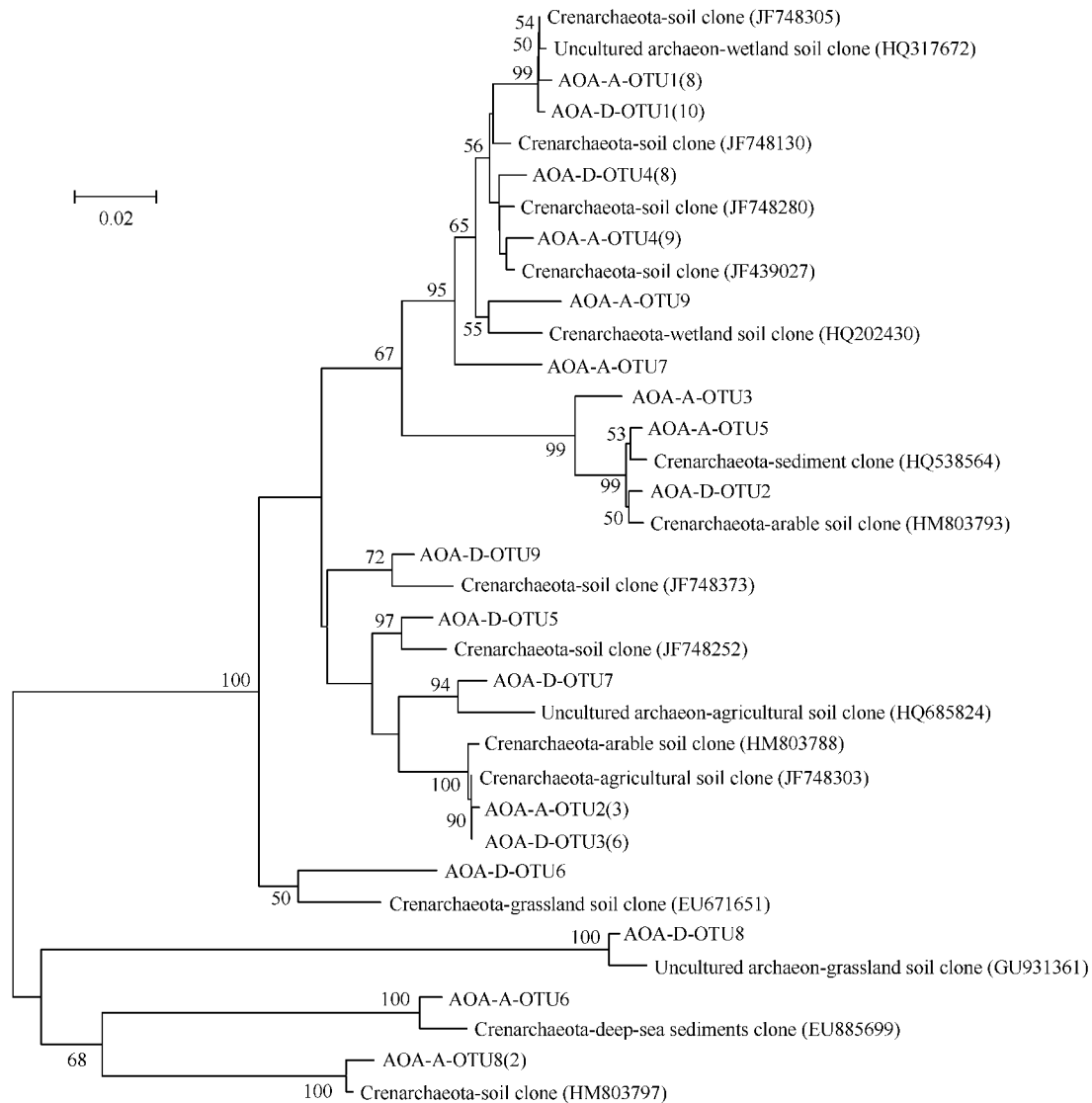


图 5 基于氨氧化古菌 *amoA* 基因 58 个氨基酸序列片段构建的系统发育树

Fig. 5 Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of AOA *amoA* gene sequences based on 58 amino acid residues from the studied soil samples to closely related sequences obtained from the GenBank database. Accessions numbers are shown in parentheses. All OTUs are shown, and the number of clones of each OTU is shown in parenthesis at the end. If there is only one clone sequence within a given OTU, the number "1" is omitted. Clones are named as follows for the example of AOA-A-OTU1: the first OTU of AOA from A sample. "AOA-D" means "AOA from D sample". Bootstrap values > 50% are shown at each node. Numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap based on 1000 replicates. Bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide.

和 2 个 OTUs。通过对 Shannon、Simpson、Richness 等多样性指数的分析,发现从湖心到湖岸草原,无论是 AOA 还是 AOB,其数量都呈增加的趋势,但生物多样性有所降低,并且在 AOB 数量远远高于其他样点的 D 样点中,其多样性最低,在种的水平上仅有 2 个 OTUs。

经系统发育分析,选取具有 2% 差异的序列定义为一个 OTU^[13],A 和 D 样点氨氧化古菌克隆序列分别具有 9 个 OTUs,均属于古菌中的泉古菌门(Crenarchaeota),有趣的是,AOA-A-OTU6 和 AOA-A-OTU5 与来源于深海或海洋沉积物的氨氧化古菌序列同源(图 5),这样的克隆序列仅在 A 样点中出现;而在 D 样点中,所有 AOA 的克隆序列都与来源于草原、农田、湿地土壤中氨氧化古菌有很高的同源

性。AOB 的系统发育显示,在 2% 序列差异的水平上,B 和 D 样点各具有 5 个和 2 个 OTUs,除 B 样点中的 1 个 OTU(只包含一个克隆序列)在 NCBI 数据库中没有找到与其相似的同源序列,2 个样点中 AOB *amoA* 基因的所有克隆序列都属于 β -变形菌纲(Betaproteobacteria),亚硝化单胞菌目(Nitrosomonadales),亚硝化单胞菌科(Nitrosomonadaceae),其中每个样点中的大部分 AOB *amoA* 基因的克隆序列序列都与亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)有一定同源性,只有很少部分与亚硝化螺菌属(*Nitrospira*)有一定同源性(图 6),由此说明退水过程对氨氧化细菌种群类型的改变没有造成显著影响。

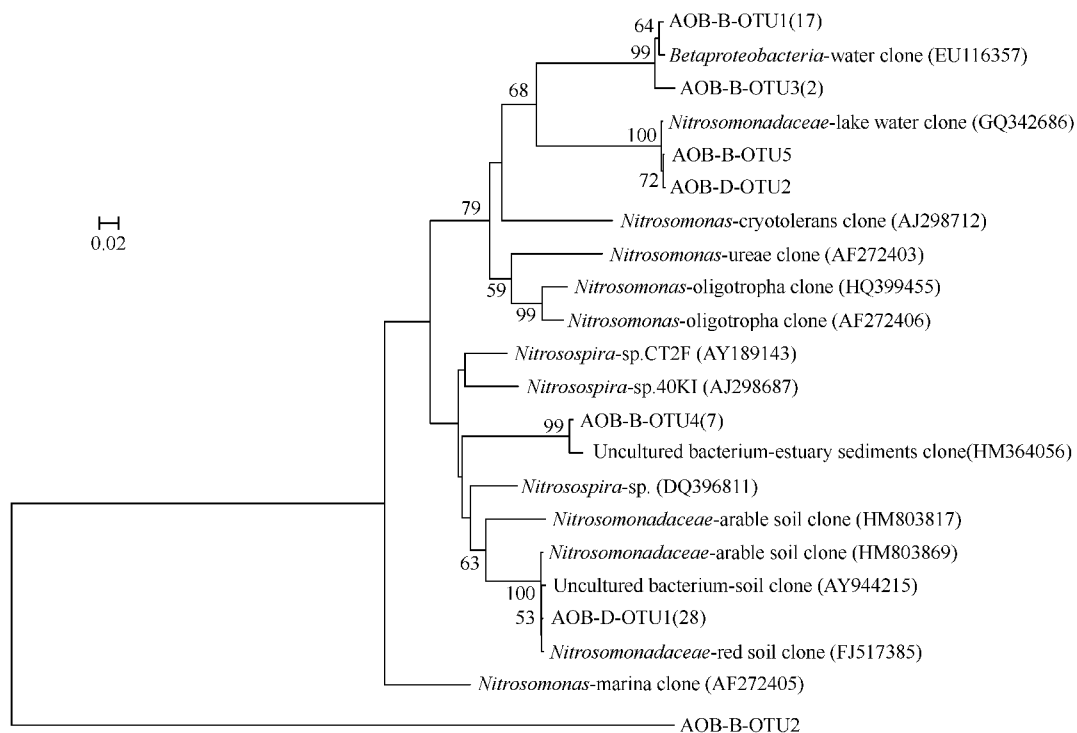


图 6 基于氨氧化细菌 *amoA* 基因 57 个氨基酸序列片段构建的系统发育树

Fig.6 Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of AOB *amoA* gene sequences based on 57 amino acid residues from the studied soil samples to closely related sequences obtained from the GenBank database. Accessions numbers are shown in parentheses. All OTUs are shown, and the number of clones of each OTU is shown in parenthesis at the end. If there is only one clone sequence within a given OTU, the number "1" is omitted. Clones are named as follows for the example of AOB-B-OTU1: the first OTU of AOB from B sample. "AOB-D" means "AOB from D sample". Bootstrap values >50% are shown at each node. Numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap based on 1000 replicates. Bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide.

3 讨论

在干涸湖泊退水过程形成的生态系统中, 氨氧化微生物的数量与种群丰度之间没有呈现正相关, 从湖心到湖岸草原, 氧化条件逐渐加强, 使得以专性好氧的化能自养过程为主的氨氧化微生物数量增加, 并且增加了对这种优势菌群的选择^[19], 例如一些研究证明在农田土壤中亚硝化螺菌属的优势, 高含量氮源的存在, 助长了亚硝化螺菌属^[20,21,22]。本研究结果显示, 在湖泊的干涸过程中, 氨氧化微生物的数量增加, 种群丰度有所降低, AOB 种群对湿地退化过程的响应尤为明显, 其数量和种群丰度对土壤中 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的变化做出了响应, 因此推测出现这一现象的原因是湖泊在逐年退水过程中, 从湖心到湖岸草原形成了一个氧浓度和 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 浓度由低到高的分布特征, 有研究显示氧的可利用性会影响 AOB 种群的分布^[23], 铵浓度是决定氨氧化菌群结构的主要因素之一。低铵浓度下的生长活力和铵饥饿后对铵恢复的响应能力, 是氨氧化微生物生态位分化的重要因子^[1]。

湖心底部的一些氨氧化古菌与来源于海洋或深海沉积物中的氨氧化古菌同源, 而在湖岸草原带并没有这样的氨氧化古菌序列, 初步推断, 由于退水的先后顺序, 使得湖心到湖岸草原带形成了具有差异的生态环境类型, 造成了湖泊湿地中各自氨氧化古菌类群的不同, 氧化条件和铵浓度的改变可能是形成这一现象重要原因, 有研究表明氨氧化古菌存在多种营养类型, 具有广阔的生态域^[24]。

系统发育分析显示, 基于 2% 的序列差异的水平, AOA 在湖心底部和湖岸草原具有 9 个 OTUs, AOB 在湖心底部和湖岸草原分别具有 5 个和 2 个 OTUs, 以及在种的水平 (基于 3% 序列差异) AOA 在湖心底部和湖岸草原分别具有 7 个和 6 个 OTUs, AOB 在湖心底部和湖岸草原中分别有 4 和 2 个 OTUs。从微观尺度在功能基因的水平上证明了湖心底部氨氧化微生物多样性较高的特征。

参考文献

- [1] 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 (*Acta Ecologica Sinica*), 2007, 27 (3): 1573-1582.
- [2] Kowalchuk GA, Stephen JR. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55 (1): 485-529.
- [3] Horz HP, Barbrook A, Field CB, Bohannan BJM. Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101 (42): 15136-15141.
- [4] 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 (12): 1985-1995.
- [5] 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 (*Acta Ecologica Sinica*), 2009, 29 (1): 406-415.
- [6] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法. 北京: 科学出版社. 2008.
- [7] 中国土壤学会农业化学专业委员会, 土壤农业化学常规分析方法. 北京: 科学出版社, 1983.
- [8] Li JY, Li B, Zhou Y, Xu JF, Zhao J. A Rapid DNA Extraction Method for PCR Amplification from Wetland Soils. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 52 (6): 626-633.
- [9] Cochran WG. Estimation of Bacterial Densities by Means of the "Most Probable Number". *Biometrics*, 1950, 6 (2): 105-116.
- [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 the United States of America*. 2005, 102 (41): 14683-14688.
- [11] Nicolaisen MH, Ramsing NB. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 2002, 50 (2): 189-203.

- [12] Schloss PD, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71(3): 1501-1506.
- [13] Konneke 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.
- [14] 黄柳琴, 蒋宏忱, 王尚, 张传伦, 董海良. 长江三峡大坝两侧水体中氨氧化微生物种群结构分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2011, 51(1): 83-90.
- [15] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596 - 1599.
- [16] Di HJ, Cameron KC, Shen JP, Winefield CS, Callaghan MO, Bowatte S, He JZ. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. *Nature*, 2009, 2: 621-624.
- [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(1038): 806-809.
- [18] Mohamed NM, Yossi KS, Tal Y, Hill RT. Diversity of aerobic and anaerobic ammonia-oxidizing bacteria in marine sponges. *International Society for Microbial Ecology*, 2010, 4: 38-48.
- [19] Li M, Cao HL, Hong YG, Gu JD. Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(4): 1243-1254.
- [20] He JZ, Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, Zheng YM, Xu MG, Di HG. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(12): 2364-2374.
- [21] Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, Zhang JB, He JZ. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1601-1611.
- [22] Kowalchuk GA, Stienstra, AW, Heilig, GHJ, Stephen JR, Woldendorp JW. Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. *Environmental Microbiology*, 2000, 2(1): 99-110.
- [23] Schramm A, Beer DD, Gieseke A, Amann R. Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. *Environmental Microbiology*, 2000, 2(6): 680-686.
- [24] Agogué H, Brink M, Dinasquet J, Herndl GJ. Major gradients in putatively nitrifying and non-nitrifying Archaea in the deep North Atlantic. *Nature*, 2008, 456(7223): 788-791.

Community structure of ammonia-oxidizing prokaryotes at the dry-up lake in Huitengxile grassland

Lihua Hui¹, Ji Zhao^{1,3*}, Linhui Wu², Yuqin Shao², Jingyu Li¹, Bing Zhu¹

¹ College of Life Sciences, ² College of Environment and Resources, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China,

³ Sino-US Center for Conservation, Energy and Sustainability Science in Inner Mongolia, Huhhot 010021, China

Abstract: [Objective] To investigate the structure of ammonia-oxidation microbial communities in the wetlands to dry-up process at 99 degraded lakes of the Huitengxile grassland in the Inner Mongolia Plateau. [Methods] The microbial quantity of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia oxidizing bacteria (AOB) were examined by most probable number-polymerase chain reaction (MPN-PCR). The clone libraries of *amoA* were constructed and phylogenetics were analyzed. With analysis of the soil properties, we evaluated the effects of wetlands degradation on ammonia-oxidation microbes communities. [Results] In 75% of the samples, the quantity of AOB communities was higher than that of AOA; moreover, quantity of bacterial were up to 18.1-fold more abundant than Archaea's. The AOB microbial quantity was strongly correlated with NH_4^+ -N content in the soil. Phylogenetic analyses of the *amoA* gene fragments showed that most AOB sequences from degraded wetlands were affiliated with *Nitrosomonas*-like species and a few close to *Nitrosospira*. All AOA sequences belonged to the kingdom Crenarchaeote. [Conclusion] Experimental results showed that quantity of ammonia-oxidation microbes increased but community diversity declined during wetlands degradation, and oxidation conditions and ammonium concentration in the soil might play important roles in the community structure of both the AOA and AOB.

Keywords: dry-up, MPN-PCR, Ammonia-oxidizing archaea, Ammonia-oxidizing bacteria, biodiversity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2009CB125909), by the National Natural Science Foundation of China (31160129) and by the National Key Technology R&D Program (2011BAC02B03)

* Corresponding author. Tel: +86-471-4991676; Fax: +86-471-4991436; E-mail: ndzj@imu.edu.cn

Received: 19 July 2011 / Revised: 14 November 2011

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。