

长期定位施肥对石灰性紫色水稻土古菌群落结构的影响

辜运富¹ 张小平^{1*} 涂仕华² Kristina Lindström³

1 (四川农业大学资源环境学院微生物系, 四川雅安 625014)

2 (四川省农业科学院土壤肥料研究所, 成都 610066)

3 (Department of Applied Chemistry and Microbial, University of Helsinki, SF-00014, Helsinki, Finland)

摘要: 为了认识长期施肥对石灰性紫色水稻土培肥和肥力演化的作用, 结合变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和限制性酶切片长度多态性(RFLP)技术, 研究了稻麦轮作下农家肥(M)、氮肥+农家肥(NM)、氮磷肥+农家肥(NPM)、氮磷钾肥+农家肥(NPKM)、无肥(CK)、氮肥(N)、氮磷肥(NP)、氮磷钾肥(NPK)等不同施肥制度对石灰性紫色水稻土古菌群落结构的影响。研究表明, 长期定位施肥明显影响土壤中的古菌组成。在长期施用氮肥+农家肥、氮磷肥和氮磷钾肥+农家肥处理的土壤中, 古菌多样性指数低于农家肥、氮磷肥+农家肥、无肥、氮肥和氮磷钾肥处理。在DGGE图谱的基础上, 分别选择种植水稻和小麦的氮磷钾肥处理土壤样品, 对古菌克隆子的16S rDNA序列进行了系统发育分析, 发现水稻土古菌与各种土壤及水体环境的古菌极其相似。对DGGE图谱的聚类分析发现, 不管是种植水稻还是小麦, 8种施肥处理的古菌都聚在3个群里。种植水稻时, M和NPK处理下的土壤古菌聚成第一个群, NP处理下的聚成第二个群, 另外5种施肥处理(NPKM, NM, CK, N和NPM)聚成第三个群。种植小麦时, NPKM和M处理下的土壤古菌聚成一个群, NP处理下的聚成第二个群, N、NPK、NM、NPM和CK处理下的聚成第三个群。聚类分析结果显示, 作物类型会影响土壤古菌群落结构。

关键词: 施肥制度, DGGE, RFLP, 古菌群落

Effect of long-term fertilization on archaeal community structure in calcareous purplish paddy soil

Yunfu Gu¹, Xiaoping Zhang^{1*}, Shihua Tu², Kristina Lindström³

1 College of Resource and Environment, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

2 Soil and Fertilizer Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China

3 Department of Applied Chemistry and Microbial, University of Helsinki, SF-00014, Helsinki, Finland

Abstract: To better understand the role that fertilization systems play in soil fertility buildup and evolution, we employed denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) to determine the influence of different fertilization treatments on archaeal community structure in calcareous purplish paddy soil under rice/wheat rotations. The eight fertilization treatments were as follows: manure only (M), nitrogen plus manure (NM), nitrogen and phosphorus plus manure (NPM), nitrogen, phosphorus and potassium plus manure (NPKM), without fertilization (CK), mineral nitrogen (N), nitrogen-phosphorus (NP) and nitrogen, and phosphorus and potassium (NPK). Our results showed that long-term fertilization significantly affected soil archaeal community structure; the richness and diversity of archaeal community under NM, NP and NPKM were lower than those under the other fertilization treatments (M, NPM, CK, N, and NPK). Based on the DGGE patterns, two soil DNA samples isolated from the NPK-amended soil were used for RFLP analysis of archaea. Phylogenetic analyses showed that archaea in the calcareous purplish paddy soil was highly diverse, and the sequences were closely related to those

archaeal sequences isolated from various soils and water environment. Cluster analysis of the DGGE profiles showed that archaeal communities under the eight fertilization treatments clustered into three groups. In soil from paddies currently under rice cultivation, the archaeal communities in the soil amended with M and NPK grouped into the first cluster, while NP was in the second group, and NPKM, NM, CK, N and NPM were in the third. In the soil with wheat cultivation, NP-treated archaeal communities clustered into a cluster, NPKM and M were in the second cluster, and N, NPK, NM, NPM and CK soil communities comprised the third cluster. The cluster analysis showed that crop type impacts the community structure of soil archaea.

Key words: fertilization system, DGGE, RFLP, archaeal communities

古菌具有独特的性质,在三域学说中被列为古菌域,是目前生物地球化学研究的热点之一。古菌广泛存在于湖泊、海洋、热泉、沉积物以及土壤中,并且含量远比早先预想的要多(Delong & Pace, 2001)。Karner等(2001)通过对太平洋海水中古菌含量的测定和估算,预计古菌占现代海洋中原核生物的1/3,其中泉古菌门为主要古菌类群,还含有小部分广古菌门种类。古菌在碳素和氮素的生物地球化学循环中起着重要作用(Garcia, 2000; van der Wielen, 2009),对控制氮素生物地球化学循环的氨氧化古菌的探索,更是当前古菌研究热点之一(Chen *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2009)。

研究表明,农业管理措施如施肥等会对土壤微生物产生重要的胁迫作用。土壤微生物是反映土壤质量变化的灵敏生物指标之一(Bastida *et al.*, 2008)。长期以来,囿于培养方法,人们对土壤微生物多样性特别是古菌多样性所知甚少(Brock, 1987)。随着各种分子生物学技术手段被不断应用于自然界微生物生态系统的研究,发现了许多前所未有的类群,这些类群对整个生物圈具有不可忽视的影响(Pace, 1997),Muyzer和Smalla(1993)首先将变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术用于研究土壤细菌群落结构,目前该技术已经广泛用于土壤微生物生态学研究领域。近年来,国内外学者们结合DGGE和RFLP等分子标记技术研究了长期定位施肥对土壤产甲烷古菌和氨氧化古菌群落结构的影响(He *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2008),但尚无关于长期定位施肥对石灰性紫色水稻土古菌的影响的报道。

紫色土是中国重要的土壤资源,总面积约 2.00×10^7 ha,是四川盆地广为分布的一种主要农业土壤(面积 1.13×10^7 ha,含重庆),其中石灰性紫色水稻土分布最广,面积约 4.00×10^6 ha (Zhu *et al.*,

2008)。为了监测施肥对石灰性紫色水稻土质量的影响并在该类土壤上建立合理的施肥制度,四川省农业科学院土壤肥料研究所于20世纪80年代初在川中紫色丘陵区石灰性紫色水稻土上建立了NPK长期定位施肥试验点。本文结合DGGE和RFLP技术,探讨了不同施肥制度对古菌群落结构的影响,为认识古菌对不同施肥制度的响应特征,了解古菌在石灰性紫色水稻土中的微域生态意义提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计

实验点位于四川省遂宁市船山区联盟乡二村五组($30^{\circ}10'50''N$, $105^{\circ}03'26''E$),为亚热带湿润季风气候。实验开始于1982年,土壤为原生钙质紫色土属,遂宁组母质,二泥田土种。实验采用完全随机区组设计方案,设置8个处理:(1)农家肥(M:主成份为猪厩肥,含有机质1.5 mg/kg);(2)氮肥+农家肥(NM);(3)氮磷肥+农家肥(NPM);(4)氮磷钾肥+农家肥(NPKM);(5)无肥(CK);(6)氮肥(N);(7)氮磷肥(NP);(8)氮磷钾肥(NPK)。各处理每种肥料的施用量为,农家肥: 3×10^4 kg/ha;氮肥(N):55.2 kg/ha;磷肥(P_2O_5):13.2 kg/ha;钾肥(KCl):31.5 kg/ha。每种处理设4次重复,共32个小区,小区面积13.2 m²。实验小区之间用水泥板隔开,重复之间留有排水沟。采用小麦/水稻轮作。长期定位施肥实验开始时土壤的原初养分状况为:pH 8.6,有机质15.9 g/kg,全氮0.109%,全磷0.135%,全钾2.689%,碱解氮66.3 mg/kg,有效磷3.9 mg/kg,有效钾130.6 mg/kg,缓效钾699.4 mg/kg。

1.2 取样方法

于2005年10月水稻收割后和2006年5月小麦收割后,在田间采用“梅花型”布点取样。用土钻钻取0–20 cm的土样,混匀,用无菌PET树脂袋封装带回

实验室。立即进行土壤总DNA的提取, 剩余土样放在-20℃的冰箱里保存以备后续分析。种植水稻和小麦后各施肥处理下表层风干土壤的含水量见表1。

1.3 土壤古菌群落结构的PCR-DGGE分析

1.3.1 主要仪器和试剂

DGGE所用仪器为DcodeTM Universal Mutation Detection System(Bio-Rad Co.), 引物扩增古菌16S rDNA V6-V8高变区(Øvreås *et al.*, 1997), 第一轮PCR扩增所用引物为PRA46F和PREA1100R, 第二轮为PARCH 340F-GC和PARCH 519R, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3.2 土壤微生物总DNA提取

采用Fast DNA SPIN Kit For Soil (Bio-Rad Co.)的试剂盒方法, 称取0.5 g于-20℃保存的土壤样品, 按试剂盒的给定步骤进行土壤微生物总DNA的提取。

1.3.3 古菌16S rDNA的PCR扩增

采用Nested-PCR程序。第一次PCR反应体系为: PCR Master Mix (天根生化科技(北京)有限公司) 25 μL, 每种引物0.5 μL (25 pmol/μL), 0.5 μL 10倍稀释的土壤总DNA, 加dd H₂O至终体积50 μL。采用Touch-down PCR程序: 94℃预变性 5 min, 94℃ 1 min, 65-55℃ 50 s(每个循环温度降低0.5℃), 72℃

1 min 30', 20个循环, 然后在55℃的退火温度下继续扩增15个循环, 72℃ 7 min, 最后于4℃恒温保存。

第二次PCR反应体系为: 第一次PCR产物1:10稀释后作模板进行PCR。体系为: 10×PCR buffer 5 μL, MgCl₂ (25 mmol/μL) 3 μL, dNTP (2.5 mmol/μL) 1 μL, 每种引物(25 pmol/μL) 0.5 μL, *Taq* DNA聚合酶(5 u/μL) 0.5 μL, 模板DNA 1 μL, 加dd H₂O至终体积50 μL。反应程序是在第一轮PCR的基础上, 退火温度变为前20个循环63-53℃, 后15个循环53℃, 其他步骤与第一次PCR相同。

取PCR产物各3 μL, 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测(DcodeTM, Bio-Rad), Bio-Rad公司凝胶成像系统(Gel Doc Documentation System)观察。

1.3.4 PCR产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

取第二次PCR产物15 μL进行DGGE分析, 变性剂梯度范围为20-50%, 聚丙烯酰胺凝胶浓度为8% (100%的变性剂为尿素7 mol/L和40%的去离子甲酰胺)。在1×TAE缓冲液中, 50 V 30 min进胶, 再在150 V 60℃下电泳5 h。电泳后采用改进的硝酸银染色法对凝胶进行染色(Riesner *et al.*, 1989)。用数码相机拍照, 指纹图谱借助于Bio-Rad公司的凝胶成像系统(Quantity One, Bio-Rad, USA)分析样品电泳条带。

表1 种植稻麦后各施肥处理下表层风干土壤含水量(%)

Table 1 Water content of air-dried top soil under different fertilization treatments after rice/wheat cultivation (%)

	施肥方式 Fertilization treatments							
	M	NM	NPM	NPKM	CK	N	NP	NPK
水稻收获后 After rice cultivation	4.043	3.993	4.987	4.057	3.969	4.990	3.942	3.753
小麦收获后 After wheat cultivation	4.855	4.887	4.232	4.209	4.173	4.783	4.075	4.787

M, 农家肥; NM, 农家肥加氮肥; NPM, 农家肥加氮磷肥; NPKM, 农家肥加氮磷钾肥; CK, 无肥; N, 氮肥; NP, 氮磷肥; NPK, 氮磷钾肥。

M, Farmyard manure; NM, Nitrogen plus farmyard manure; NPM, Nitrogen, phosphate plus farmyard manure; NPKM, Nitrogen, phosphate and potassium plus farmyard manure; N, Nitrogen; NP, Nitrogen and phosphate; NPK, Nitrogen, phosphate and potassium; CK, No fertilizer.

表2 DGGE实验中古菌16S rDNA的特异性扩增引物(引自Øvreås *et al.*, 1997)

Table 2 Specific amplification primers for the archaeal 16S rDNA in DGGE experiment (adopted from Øvreås *et al.*, 1997)

引物 Primer	16S rDNA目标区(碱基数) 16S rDNA target (base number)	引物序列 Primer sequence
PRA46F	Archaea (46-60)	5'- C/TTAAGCCATGCG/AAGT-3'
PREA1100R	Archaea (1100-1117)	5'- T/CGGGTCTCGCTCGTTG/ACC-3'
PARCH340F-GC	Archaea V3 region (340-358)	5'- CCTACGGGGC/TGACG/CCAG-3'
PARCH519R	Archaea V3 region (519-534)	5'- TTACCGCGGCG/TGCTG-3'

在PARCH 340F引物的5'端添加“GC”夹板: 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGACGGGGG-3'序列。

The sequence of GC-clamp: 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGACGGGGG-3' was added at the 5' end of primer PAR-CH340F.

图像处理过程中,对于在DGGE电泳图上肉眼可见、但被软件忽略掉的一些小条带进行手动处理,条带的密度由该软件自动算出。

1.4 古菌16S rDNA的克隆、RFLP实验及测序

在DGGE的基础上,根据带型的丰富度,选择NPK肥料处理下的两季土壤DNA(种植水稻和小麦的土壤)作为材料,进行RFLP实验,了解石灰性紫色水稻土古菌系统发育地位。PCR反应体系与1.3.3节第二次相同。仍采用Nested-PCR程序,与1.3.3节中相同,只是在第一轮PCR中,退火温度不是降落式,而是稳定在56℃。第一次PCR引物为Ar4F和Ar958R;第二次PCR引物为Ar9R和Ar3F(表3)。

第二次PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后用Clean-Up™ PCR产物纯化试剂盒(MO Bio Laboratories, Inc., Solana Beach, CA, USA)进行纯化。纯化后的PCR产物直接连接到pGEM-T easy (Promega)载体上。每个土壤样品挑取100个阳性克隆子,利用AvaI和MspI两种限制性内切酶进行单酶切。将酶切图谱中明显不同的阳性克隆子送宝生物工程(大连)有限公司进行测序。所得序列放到NCBI上进

上进行比对,利用ClustalX 1.83与相似度最高的序列以及部分已知古菌的序列构建系统发育树,并用MEGA 4.0软件进行修改。序列信息查询号为:FJ481933至FJ481944。

1.5 数据处理

方差分析利用SPSS 12.0完成。DGGE指纹图谱利用Bio-Rad公司的Quantity One 4.1.1软件分析。用Shannon多样性指数(H)、丰富度(S)和均匀度(EH)来评价细菌的多样性。根据如下公式计算(Saikaly *et al.*, 2005):

$$H = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i = -\sum_{i=1}^S (N_i / N) \ln(N_i / N)$$

$$EH = H/H_{\max} = H/\ln S$$

其中, P_i 为某一条带的强度与同泳道中所有条带总强度的比值, S 为每一泳道总的条带数。

2 结果

2.1 不同施肥处理土壤古菌的DGGE图谱分析

不同施肥制度对石灰性紫色土古菌群落结构影响的DGGE图谱见图1。通过图1可以看出,不同

表3 RFLP实验中古菌16S rDNA的特异性扩增引物

Table 3 Specific amplification primers for the archaeal 16S rDNA in RFLP experiment

引物 Primers	16S rDNA目标区(碱基数) 16S rDNA target (base number)	引物序列 Primer sequence	参考文献 References
Ar4F	Archaea (8-25)	5'-TCY GGT TGA TCC TGC CRG-3'	Hershberger <i>et al.</i> , 1996
Ar958R	Archaea (958-967)	5'-YCC GGC GTT GAV TCC AAT T-3'	Delong, 1992
Ar9R	Archaea (906-927)	5'-CCC GCC AAT TCC TTT AAG TTT C-3'	Jurgens <i>et al.</i> , 1997
Ar3F	Archaea (7-26)	5'-TTC CGG TTG ATC CTG CCG GA-3'	Jurgens <i>et al.</i> , 1997

Y=C或U碱基, V=A或C或G Base Y equals to base C or U, base V equals to base A or base C or base G

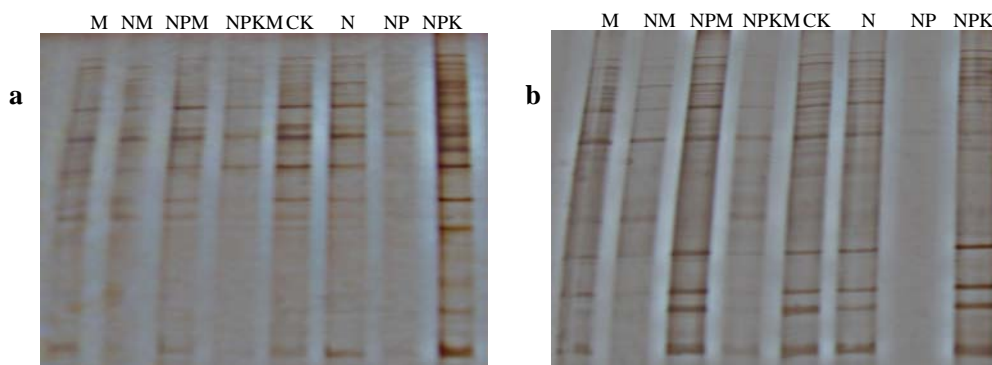


图1 土壤古菌16S rDNA的DGGE分析(a, 种植水稻后土壤; b, 种植小麦后土壤)

Fig. 1 DGGE analysis (a, soil after rice; b, soil after wheat) of archaeal 16S rDNA gene retrieved from the soils

施肥制度下的土壤古菌DGGE图谱条带在条带数量和强弱上各不相同,说明古菌的群落结构有明显差异,显示长期定位施肥会影响土壤中的古菌群落结构。本实验共测定了8种施肥制度对石灰性紫色土古菌群落结构的影响,结果显示不论是种植水稻还是小麦, NM、NP和NPKM 3种施肥处理下的古菌群落结构多样性指数均低于其他5种施肥处理(M、NPKM、CK、N和NPK)(表4),其中以NPK处理下的土壤古菌多样性最丰富,最简单的是NP处理下的土壤。

DGGE结果说明,石灰性紫色土上种植水稻和小麦会对土壤中的古菌群落结构造成明显影响。同时,不同施肥处理下古菌具有一些共同的优势条带,说明不同施肥处理对石灰性紫色土中优势古菌

类群的影响有限。

2.2 土壤古菌群落结构相似性分析

不同施肥处理下土壤古菌DGGE图谱的聚类分析见图2。土壤种植水稻后的DGGE聚类结果显示,当相似性系数<0.55时,土壤中古菌聚成3类: NPK肥和M肥处理的土壤古菌聚成第一个群, NP肥料处理的土壤古菌单独聚成第二个群, NPKM、NM、CK、N和NPM 5种施肥处理的古菌聚成第三个群。在种植小麦的土壤中,当相似性系数<0.61时, NP处理下的土壤古菌聚成第一个群, NPKM肥和M肥处理的土壤古菌聚成第二个群, NPM、CK、NM、N和NPK处理单独聚成另外一个群。显示不同施肥制度对土壤古菌群落结构相似性具有明显影响。

表4 不同施肥处理下古菌的Shannon多样性指数(H), 丰富度(S)和均匀度(EH)

Table 4 Archaea diversity as indicated by the number of DNA bands, Shannon diversity index (H), richness (S), and evenness (EH)

施肥处理 Fertilization treatments	Shannon多样性指数 Shannon's diversity index (H)		丰富度 Richness (S)		均匀度 Evenness (EH)	
	水稻 Rice	小麦 Wheat	水稻 Rice	小麦 Wheat	水稻 Rice	小麦 Wheat
M	3.08±0.13 ^a	3.13±0.14 ^a	21±2.00 ^a	20±2.00 ^a	1.016±0.00 ^a	1.014±0.00 ^a
NM	2.94±0.09 ^a	2.99±0.07 ^{ab}	18±1.15 ^b	19±1.53 ^{ab}	1.017±0.00 ^a	1.018±0.01 ^a
NPM	3.04±0.09 ^a	3.09±0.09 ^a	20±1.53 ^a	21±1.53 ^a	1.014±0.05 ^a	1.015±0.00 ^a
NPKM	2.99±0.09 ^a	2.99±0.03 ^{ab}	19±0.58 ^b	19±1.53 ^{ab}	1.017±0.05 ^a	1.017±0.01 ^a
CK	3.09±0.07 ^a	3.04±0.07 ^{ab}	21±1.16 ^a	20±1.15 ^a	1.015±0.05 ^a	1.015±0.00 ^a
N	2.99±0.09 ^a	3.08±0.03 ^{ab}	19±0.06 ^b	21±1.53 ^a	1.014±0.00 ^a	1.017±0.00 ^a
NP	2.89±0.09 ^b	2.89±0.07 ^b	17±1.15 ^b	17±1.53 ^b	1.019±0.00 ^a	1.020±0.01 ^a
NPK	3.13±0.16 ^a	3.04±0.11 ^{ab}	22±2.08 ^a	20±3.00 ^a	1.013±0.03 ^a	1.014±0.00 ^a

施肥处理代号同表1, 同一列中不同字母表示在5%的水平上差异显著。The eight fertilization treatments correspond to those in Table 1. Values in the same column with different superscripts differ significantly at 5% level.

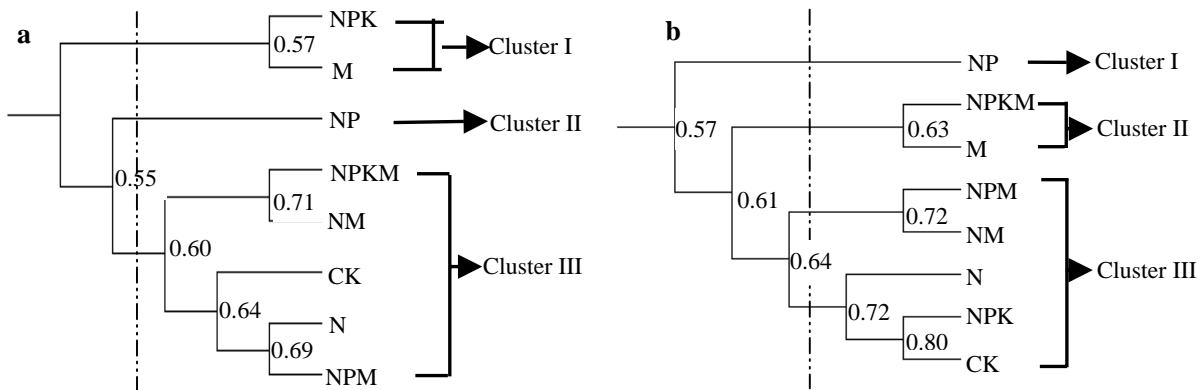


图2 土壤古菌16S rDNA DGGE指纹图谱的聚类分析图(a, 种植水稻后土壤; b, 种植小麦后土壤)

Fig. 2 Cluster analysis of 16S rDNA DGGE profiles for archaeal communities in the soil after rice (a) and wheat (b)

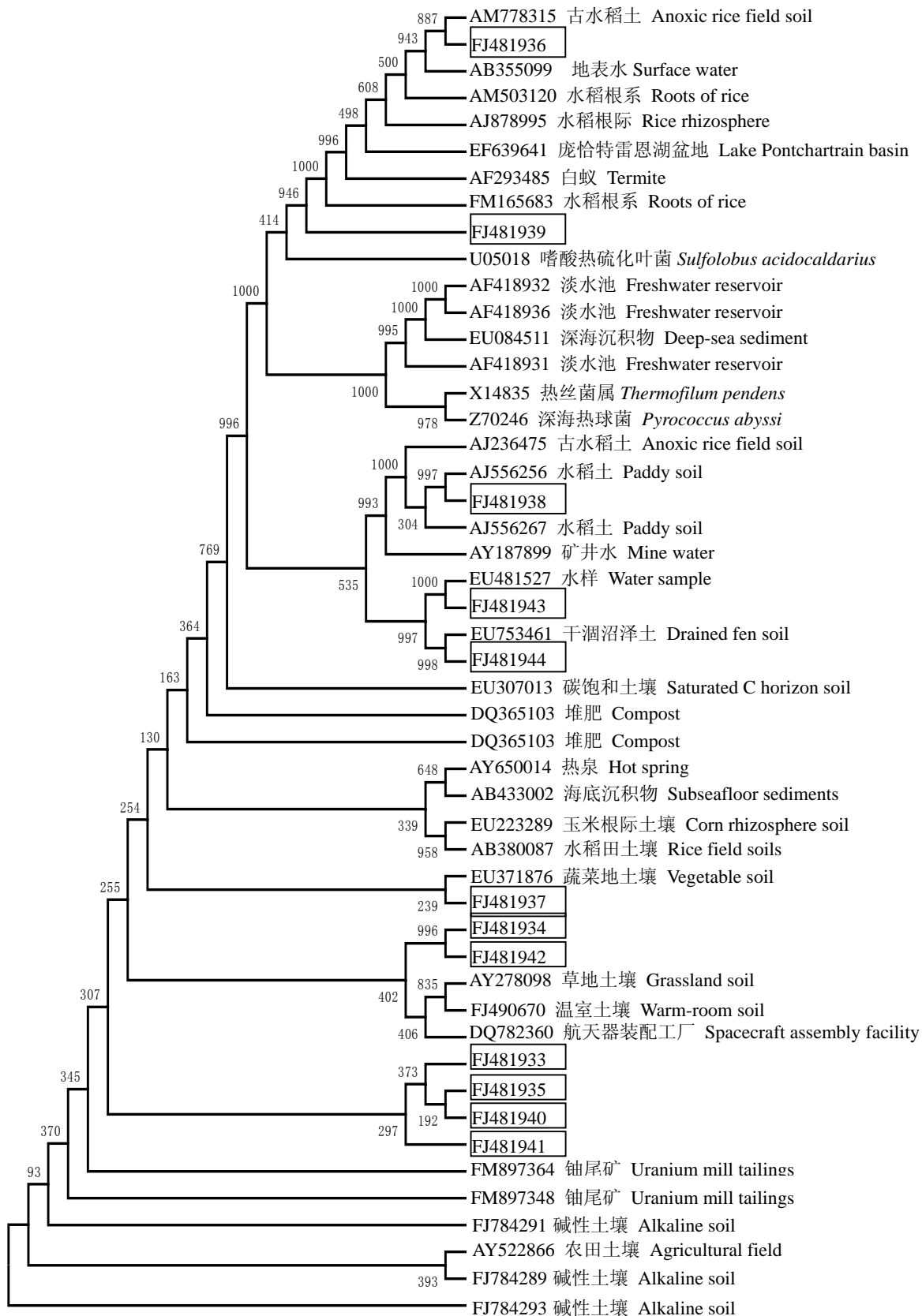


图3 石灰性紫色水稻土古菌16S rDNA克隆文库序列的系统发育图, 有方框的序列号为本实验所得。

Fig. 3 Phylogenetic tree based on archaeal 16S rDNA library and some other known archaeal 16S rDNA sequences. The sequences in squares were isolated in this study.

2.3 典型古菌种群的克隆、RFLP和序列分析

系统发育树(图3)显示, 水稻土古菌序列与来自不同土壤和水体环境的古菌具有明显相似性, FJ481936与水稻田厌氧土壤中的古菌AM778315聚在一起, FJ481939与水稻根际土壤中的古菌FM165683相似, FJ481938与水稻土中的古菌AJ556256接近, FJ481943和FJ481944分别与水体环境古菌EU481527和干涸沼泽土中古菌EU753461聚在两个不同的群里, FJ481934和FJ481942与草地土壤古菌AY278098聚在一个簇里, FJ481937与蔬菜地地土壤古菌EU371876较接近, FJ481933、FJ481935、FJ481940和FJ481941等4个古菌序列单独聚在一个群里。系统发育结果显示石灰性紫色土古菌群落结构复杂。

3 讨论

鉴定土壤中的古菌多样性对于认识古菌在生物圈中的生态学作用以及分析微生物群落的发育具有重要的意义(Timonen & Bomberg, 2009)。学者们研究了不同施肥处理对土壤古菌特别是氨氧化古菌的影响(Di *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010), He等(2008)研究发现NPK肥与有机肥配施对土壤氨氧化古菌和氨氧化细菌的影响最明显, Gu等(2009)亦发现化学肥料配施农家肥比单施化学肥料更能明显提高石灰性紫色水稻中的细菌多样性。但本实验却显示NPK与有机肥配施并不利于土壤古菌群落的发育, 显示不同施肥制度对土壤中的不同微生物形成选择性影响, 原因可能是不同微生物类群对营养物质的需求具有选择性。

本实验中, M、NPM、CK、N和NPK处理下的土壤古菌群落多样性高于NM、NPKM和NP几种施肥处理。NPK肥料处理下土壤古菌多样性最高, 而NP处理下的最低, 这也许是由于PK肥的配合使用有利于土壤中古菌的发育(Conrad & Klose, 2005)。对古菌DGGE图谱的聚类分析表明, 不管在石灰性紫色土上种植水稻还是小麦, 8种施肥处理均聚在3个群里。Watanabe等(2006)研究发现土壤中的产甲烷古菌主要受土壤类型的影响, 而受土壤施肥制度与作物种植方式的影响相对较小, 原因可能与产甲烷古菌主要介导了淹水土壤中丙酸盐的厌氧氧化有关(Lueders, 2004)。本实验与上述研究结果相似,

由于长期定位施肥并不能改变石灰性紫色土本身的特性, 所以在两幅DGGE图(图1)中, 可以看见不同施肥处理之间有大量的共有条带。

分子生物学研究发现嗜热型古菌在地球环境中广泛存在(Sandaa & Enger, 1999)。对古菌16S rDNA克隆文库序列的系统发育分析发现, 石灰性紫色土中的古菌与不同土壤和水体环境里的古菌相似。本实验发现施肥能够对石灰性紫色水稻土古菌群落结构产生明显的胁迫, 这个结果将有助于我们进一步认识施肥与古菌群落之间的关系, 为更全面深入地了解古菌多样性与功能的关系, 筛选一些重要的功能基因(如控制N和C循环的基因)可能会大有裨益(Fournier, 2011)。

参考文献

- Bastida F, Zsolnay A, Hernandez T, Garcia C (2008) Past, present and future of soil quality indices: a biological perspective. *Geoderma*, **147**, 159–171.
- Brock TD (1987) The study of microorganisms *in situ*: progress and problems. *Symposia of the Society for General Microbiology*, **41**, 1–17.
- Chen X, Zhang LM, Shen JP, Xu ZH, He JZ (2010) Soil type determines the abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in flooded paddy soils. *Journal of Soils and Sediments*, **10**, 1510–1516.
- Chen XP, Zhu YG, Xia Y, Shen JP, He JZ (2008) Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil? *Environmental Microbiology*, **10**, 1978–1987.
- Conrad R, Klose M (2005) Effect of potassium phosphate fertilization on production and emission of methane and its ^{13}C -stable isotope composition in rice microcosms. *Soil Biology and Biochemistry*, **37**, 2099–2108.
- Delong EF, Pace NR (2001) Environmental diversity of bacteria and archaea. *BMC System Biology*, **50**, 470–478.
- Di HJ, Cameron KC, Shen JP, Winefield CS, O'Callaghan M, Bowatte S, He JZ (2009) Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. *Nature Geoscience*, **2**, 621–624.
- Fournier GP, Dick AA, Williams D, Peter GJ (2011) Evolution of the archaea: emerging views on origins and phylogeny. *Research in Microbiology*, **162**, 92–98.
- Garcia JL, Patel BKC, Ollivier B (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic archaea. *Anaerobe*, **6**, 205–226.
- Gu YF, Zhang XP, Tu SH, Vestberg M, Lindström K (2009) Soil microbial biomass, crop yields, and bacterial community structure as affected by long-term fertilization treatments under wheat-rice cropping. *European Journal of Soil Biology*, **45**, 239–246.
- He JZ, Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, Zheng YM, Xu MG, Di HJ (2008) Quantitative analyses of the abundance and com-

- position of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, **9**, 2364–2374.
- Hershberger KL, Barns SM, Reysenbach AL, Dawson SC, Pace NR (1996) Wide diversity of Crenarchaeota. *Nature*, **384**, 420.
- Jurgens G, Lindström K, Saano A (1997) Novel group within kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 803–805.
- Karner MB, DeLong EF, Karl DM (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific ocean. *Nature*, **409**, 507–510.
- Lueders T, Pommerenke B, Friedrich MW (2004) Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 5778–5786.
- Muyzer G, Smalla K (1993) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 127–141.
- Øvreås L, Forney L, Daae FL, Torsvik V (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 3367–3373.
- Pace NR (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, **276**, 734–740.
- Peng JJ, Lü Z, Rui JP, Lu YH (2008) Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 2894–2901.
- ronmental Microbiology*, **74**, 2894–2901.
- Riesner D, Steger G, Zimmat R, Owens RA, Wagenhöfer M, Hillen W, Vollbach S, Henco K (1989) Temperature gradient gel electrophoresis of nucleic acids: analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein nucleic acid interactions. *Electrophoresis*, **10**, 377–389.
- Saikaly PE, Stroot PG, Oerther DB (2005) Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 5814–5822.
- Sandaa RA, Enger TV (1999) Abundance and diversity of archaea in heavy-metal-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 3293–3297.
- Timonen S, Bomberg M (2009) Archaea in dry soil environments. *Phytochemistry Reviews*, **8**, 505–518.
- van der Wielen P, Voost S, van der Kooij D (2009) Ammonia-oxidizing bacteria and archaea in groundwater treatment and drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 4687–4695.
- Watanabe T, Kimura M, Asakawa S (2006) Community structure of methanogenic archaea in paddy field soil under double cropping (rice-wheat). *Soil Biology and Biochemistry*, **38**, 1264–1274.
- Ye W, Liu X, Lin S, Tan J, Pan J, Li D, Yang H (2009) The vertical distribution of bacterial and archaeal communities in the water and sediment of Lake Taihu. *FEMS Microbiology Ecology*, **70**, 107–120.
- Zhu B, Wang T, You X, Gao MR (2008) Nutrient release from weathering of purplish rocks in the Sichuan Basin, China. *Pedosphere*, **18**, 257–264.

(责任编辑: 贺纪正 责任编辑: 时意专)