

doi : 10. 16473/j. cnki. xblykx1972. 2018. 01. 012

土壤脲酶活性调控因素和脲酶活性细菌系统发育研究*

张知晓¹, 泽桑梓², 户连荣¹, 刘凌¹, 季梅¹

(1. 云南省林业科学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省林业有害生物防治检疫局, 云南 昆明 650051)

摘要: 为探究利用脲酶活性细菌调控土壤脲酶活性的可行性, 以土壤、土壤关联脲酶活性材料及土壤无关联脲酶活性材料为对象, 采用土壤理化性质分析、脲酶活性细菌分离及其系统发育分析的方法, 分析了包括土壤脲酶细菌在内的土壤脲酶相关理化性质, 并分析了土壤与其关联材料及其他环境中脲酶活性细菌的种类及系统发育情况。结果表明, 土壤脲酶活性细菌、有机质、总氮、C/N、硝酸根离子、无机氮含量是土壤脲酶活性的关联因素, 且土壤有机质、C/N和土壤脲酶活性细菌是直接影响因素。通过细菌分离和16s rRNA测序, 土壤中分离出2门5属9种脲酶活性细菌, 厚壁菌门是优势类群, 土壤关联脲酶活性材料中发现3门8属9种脲酶活性细菌, 变形菌门是优势类群。仅粪产碱菌和绿脓杆菌2种细菌在2种材料(即土壤及土壤关联脲酶活性材料)中均被发现。

关键词: 土壤脲酶; 脲酶活性; 脲酶活性细菌

中图分类号: S 154 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-8246 (2018) 01-0065-09

Regulatory Factors of Soil Urease Activity and Phylogenetic Analysis of Urease Bacteria

ZHANG Zhi-xiao¹, ZE Sang-zi², HU Lian-rong¹, LIU Ling¹, JI Mei¹

(1. Yunnan Academy of Forestry, Kunming Yunnan 650201, P. R. China;

2. Yunnan Forest Pest Control and Quarantine Bureau, Kunming Yunnan 650051, P. R. China)

Abstract: To explore the feasibility of using urease activity bacteria to control soil urease activity, soil, urease activity materials related and non-related soil were used as materials, soil physicochemical properties analysis, urease activity bacterial isolation and phylogenetic analysis were used to analyze soil physical and chemical properties including soil urease bacteria and the diversity of soil urease activity bacterial. The results found that the effective factors of soil urease activity were the number of urease-active bacteria, the content of organic matter and total nitrogen, C/N, *et al.* Especially, the number of urease-active bacteria, the content of organic matter and C/N were directly effective factor of soil urease-activity. The diversity of urease-active bacteria was studied based on 16S rRNA BLAST and phylogenetic analysis. The results found that there were 9 species of urease-active bacteria in soil, and belong to 5 genus and 2 phylums, the majority of urease-positive species were in the Firmicutes. In urease activity material associated with soil, 9 species of urease-active bacteria were found which belong to 8 genus and 3 phylums, the majority of urease-positive species were in the Proteobacteria. Only *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* were found in both two materials.

Key words: soil urease; urease activity; urease-positive bacteria

* 收稿日期: 2017-05-17

基金项目: 云南省技术创新人才培养对象2013HB124。

第一作者简介: 张知晓(1988-), 女, 研究实习员, 主要从事森林微生物资源开发与利用研究。E-mail:36062613@qq.com

通讯作者简介: 季梅(1975-), 女, 研究员, 主要从事森林资源保护与有害生物研究。E-mail:emma@163.com

脲酶是一种专一性尿素水解酶,在农林业生态系统中扮演关键角色。土壤脲酶可分解氮肥和尿素产生铵根离子,为植物提供营养^[1],还能调节植物根际分泌物的分泌,进而影响根际细菌和线虫的种类和数量,具有防治根部病害的潜力^[2]。我国氮肥利用率不足40%^[3],与土壤脲酶活性有很大关系。农业上利用土壤脲酶的分解作用提高土壤肥力,但尿素氮转化速度过快,植物来不及吸收利用,导致营养挥发损失^[4]。因此,如何调控土壤脲酶活性以服务于农林业生产值得研究。

目前土壤脲酶活性的研究多集中于向土壤中施用化学类脲酶抑制剂,来控制氮肥的释放速度,然而这多伴随着严重的环境污染问题^[5]。此外,土壤有机质、全氮、全磷、速效氮、速效钾、土壤pH和重金属离子等土壤理化性质已被多项研究证明是土壤脲酶活性的影响因素^[6]。土壤中还存在植物、真菌和细菌等脲酶活性生物。细菌在土壤中种类和数量最多,也具有较强的产酶能力^[7]。然而目前脲酶活性细菌与土壤脲酶活性的关联性尚不明确,脲酶活性细菌对土壤脲酶活性规律影响的研究尚属空白。细菌在土壤的成功定殖是影响酶活性的前提。在农业上常用沼气渣、动物粪便、农家肥和淤泥作为肥料施入土壤中^[8],而这些物质中的脲酶活性细菌也被带入土壤中,分析这类肥料与施肥后的土壤中脲酶细菌差异,能够了解细菌经过长期农业施肥措施后,能否成功在土壤定殖,进而明确外源添加脲酶活性细菌调节土壤脲酶活性的可行性,为调控土壤脲酶活性找到新途径。此外,进一步研究土壤脲酶细菌多样性和其他生境的脲酶活性细菌多样性特点,也能为后期研究利用微生物制剂改良和管理土壤,防治植物根部病害提供科学依据。

1 研究区域与研究方法

1.1 供试材料

(1) 土壤 在云南省昆明市东川区因民镇(26°19'28"N、102°53'21"E)随机选取20块农田[前茬作物主要为豌豆(*Lathyrus splendens*)、萝卜(*Raphanus sativus*)以及白菜(*Brassica chinensis* var. *oleifera*)],每块农田采用十字交叉法,选取5个取样点,每个样点取样直径5cm处,土层深度0-20cm的土壤样品置于塑料袋中充分混匀组成混合样品,土样过20目筛后,每块农田独立取1份

副样(500g)置于塑料袋中,带回实验室后置于4℃的冰箱中保存备用。

(2) 土壤关联的脲酶活性材料 在云南省昆明市东川区因民镇(26°19'28"N、102°53'21"E)取沼气渣(5份)、动物粪便(鸡粪、猪粪、驴粪、牛粪和羊粪共计5份)、农家肥(5份)和淤泥(5份)。

(3) 土壤无关联脲酶活性材料 来源于南海北部和印度洋沿海红树林的海底淤泥由云南大学微生物研究所提供,共25份;不同种类的珍稀动物粪便[圆通山动物园:大象(*Elephas maximus*)、羊驼(*Vicugna pacos*)、棕熊(*Ursus arctos*)、马来熊(*Helarctos malayanus*)、东北虎(*Panthera tigris*)、孟加拉虎(*Panthera tigris*)、白虎(*Panthera tigris*)、长颈鹿(*Giraffa camelopardalis*)、麋鹿(*Elaphurus davidianus*)、梅花鹿(*Cervus nippon*)]共计10份]。

1.2 土壤理化性质分析

土壤脲酶活性采用靛酚比色法测定^[9];土壤总N测定先用凯氏消化,然后用NaOH进行蒸馏,最后通过25mmol/L的H₂SO₄进行滴定(硼酸指示剂)^[10];土壤铵态氮和硝态氮用2mol/L的KCl进行提取,后进行蒸馏和滴定^[11];土壤有机质含量测定用重铬酸钾容量法^[12];土壤pH测定采用pH计法完成^[13]。

1.3 脲酶活性细菌分离及其物种多样性分析

1.3.1 培养基

LB培养基 酵母提取物10g,蛋白胨5g,NaCl5g,水1L,pH7。

酸性平板培养基 蛋白胨3g,葡萄糖20g,KH₂PO₄2g,NaCl5g,MgSO₄0.1g,Na₂HPO₄1g,尿素10g,溴甲酚红0.1g,琼脂30g,pH5.5。

中性平板培养基 蛋白胨2g,葡萄糖10g,KH₂PO₄2g,NaCl3g,MgSO₄0.1g,Na₂HPO₄1g,尿素10g,中性酚红0.1g,琼脂30g,pH7.0。

碱性平板 蛋白胨2g,葡萄糖10g,KH₂PO₄2g,NaCl3g,MgSO₄0.1g,Na₂HPO₄1g,尿素10g,百里酚酞0.1g,琼脂30g,pH10.0。

NH₄⁺-YE培养基 酵母粉3g,葡萄糖10g,KH₂PO₄2g,NaCl3g,MgSO₄0.1g,Na₂HPO₄1g,NiCl0.01g,尿素10g,百里酚酞0.1g,琼脂30g,pH6.0。

1.3.2 菌株的分离

土壤样品中脲酶活性细菌分离采用蔗糖离心

法^[14]。称取 1g 新鲜土壤样品，置于 10mL 70% 蔗糖溶液中。30℃，180rpm 震荡培养 30min，后取出离心（500rpm，1min），取上清液用灭菌水稀释至 10^{-2} ，涂布酸性、中性和碱性平板，每种样品，每种培养基涂布 3 皿。30℃ 黑暗条件恒温培养 7d 后计数形成蓝色或红色晕圈的菌落数，并挑取变色菌落在 LB 培养基上进行纯化，纯化的菌落在 NH_4^+ -YE 培养基上做进一步鉴定，产生相同颜色变化和刺激性氨味的细菌则鉴定为脲酶活性细菌^[15]。土壤脲酶活性细菌数量计算公式为，脲酶活性细菌数量 (CPU) = \sum 菌落数 \times 500。

1.3.3 菌株的分子鉴定

脲酶活性细菌的 16S rRNA 测序是用 LB 平板活化脲酶活性菌株，并接种至 LB 营养液中，180rpm/min 震荡培养至对数期，取 2mL 菌液离心收集菌体，用细菌基因组 DNA 提取试剂盒按照操作说明提取细菌总 DNA。细菌总 DNA 用细菌通用引物 (27F & 1492R) 进行 PCR 扩增，扩展体系为 50 μ L (10 \times PCR Buffer 5.0 μ L, dNTP Mix 4.0 μ L, Primer - L 2.0 μ L, Primer - R 2.0 μ L, 模板 DNA 1.0 μ L, rTaq 酶 0.5 μ L, DD H₂O 35.5 μ L)，反应条件是 95℃ 预变性 5min，95℃ 变性 30s，55℃ 退火 30s，72℃ 延伸 1min，35 个循环，72℃ 延伸 10min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳完成检测，条带清晰的 PCR 产物用 DNA 琼脂糖回收。回收 DNA 连接至 PMD18-T 质粒，并转化至 *Escherichia coli* DH5 α 后，送北京华大基因完成测序^[16-17]，测序结果在 NCBI 上进行比对，以鉴定脲酶活性细菌的种类。

1.4 其他生境中脲酶活性细菌分离及其物种多样性分析

每种样品准确称量 1g 置于 10mL 1% 的尿素溶液中，30℃，180rpm/min 震荡富集培养 24h。取出后震荡均匀，取 1mL 样品溶液进行离心 (500 rpm/min)，取上清液 1mL 用灭菌水稀释至 10^{-2} ，取 200 μ L 涂布酸性、中性和碱性平板，每种样品，每种培养基涂布 3 皿。30℃ 黑暗条件恒温培养 7d 后，挑取变色菌落在 LB 培养基上进行纯化，纯化的菌落在 NH_4^+ -YE 培养基上培养 3d 再次鉴定，产生相同颜色变化和刺激性氨味的细菌则鉴定为脲酶活性细菌，脲酶活性细菌用 20% - 30% 的甘油液于 -20℃ 进行编号冻存备用。

脲酶活性细菌的 16S rRNA 测序的方法按照本

章 1.3 描述的方法完成。

1.5 数据分析

土壤的理化性质数据在统计分析前进行正态分布和方差齐次性检验，不符合正态分布的数据用 $\log(x+1)$ 进行标准化处理。采用 SPSS 16.0 软件完成数据的方差分析、SNK 分析、相关分析、通径分析和主成分分析等统计分析。16S rRNA 序列数据则利用 EzTaxon 和 BLAST 软件进行在线相似性分析，采用 Clustal X 软件进行多系列比较，并用 MEGA 4.1 软件进行系统发育进化分析。

2 结果与分析

2.1 土壤脲酶活性的关联因素

土壤样品的脲酶活性和理化性质见表 1。由表 1 可知，土壤的脲酶活性是 4.43-45.70U，平均是 16.64U；土壤的有机质含量是 21.24-73.58mg/g，平均是 37.68mg/g；土壤的总氮含量是 1.18 - 1.75mg/g，平均是 1.45mg/g；土壤的 C/N 是 14.35-42.05，平均是 25.24；土壤的铵离子含量是 10.69-16.44 μ g/g，平均是 13.07 μ g/g；土壤的硝酸根离子含量是 5.61 - 44.77 μ g/g，平均是 17.75 μ g/g；土壤的无机氮含量是 20.06 - 58.72 μ g/g，平均是 30.82 μ g/g；土壤的脲酶活性细菌数量是 3.24 - 18.15 $\times 10^3$ CFU，平均是 7.82 $\times 10^3$ CFU；土壤的 pH 值是 5.60-6.54，平均是 6.09。

由表 2 可知，土壤脲酶活性和土壤有机质含量 ($r=0.747^{**}$)、土壤总氮含量 ($r=0.985^{**}$)、土壤 C/N ($r=0.624^{**}$)、土壤硝酸根离子浓度 ($r=0.914^{**}$)、土壤无机氮含量 ($r=0.862^{**}$)、土壤脲酶活性细菌数量 ($r=0.976^{**}$) 具有极显著正相关性，和土壤 pH ($r=-0.606$) 和土壤铵离子浓度 ($r=-0.114$) 呈现负相关关系，但未达到显著水平。

由表 3 可知，土壤脲酶活性影响因子的通径系数为，土壤有机质含量 (1.755 **)、总氮含量 (-0.105)、C/N (-1.370 **)、铵根离子浓度 (-0.506)、硝酸根离子浓度 (-4.324)、无机氮含量 (4.071)、土壤脲酶活性细菌数量 (0.835 **) 和土壤 pH (-0.056)，其中土壤有机质含量、C/N 和土壤脲酶活性细菌数量对土壤脲酶活性的直接影响达到极显著水平。

表1 土壤样品的理化性质

Tab. 1 Soil physicochemical and biochemical properties

编号	UA /U	OM /mg · g ⁻¹	SN /mg · g ⁻¹	C/N	NH ₄ ⁺ -N /μg · g ⁻¹	NO ₃ ⁻ -N /μg · g ⁻¹	MN /μg · g ⁻¹	Bacteria /10 ³ CFU	pH
1	45.70±3.15	73.58±4.73	1.75±0.13	42.05±0.46	13.66±1.05	44.10±2.11	57.76±3.16	18.15±1.41	5.60±0.08
2	33.62±2.29	67.51±2.48	1.67±0.13	40.43±1.56	12.83±1.11	43.01±2.17	55.84±3.28	16.25±1.26	5.79±0.08
3	25.93±1.75	65.99±3.83	1.72±0.13	38.37±0.66	13.95±1.06	44.77±2.15	58.72±3.21	11.35±0.96	5.76±0.06
4	24.14±1.32	56.89±3.55	1.65±0.12	34.48±0.44	12.14±1.06	41.37±2.92	53.51±3.98	11.12±0.94	5.92±0.07
5	22.26±1.14	51.58±3.74	1.61±0.12	32.04±0.08	12.34±1.17	16.80±1.15	29.14±2.32	9.52±0.81	5.83±0.06
6	20.24±1.49	45.51±3.55	1.57±0.12	28.99±0.09	13.03±1.20	11.79±1.95	24.81±3.14	8.12±0.69	6.14±0.07
7	19.95±1.47	37.17±2.48	1.50±0.11	24.78±0.21	11.21±1.26	17.30±1.99	28.51±3.26	7.83±0.66	6.25±0.04
8	17.60±1.12	23.52±1.74	1.53±0.11	15.37±0.02	12.38±1.92	10.23±1.07	22.61±2.99	7.15±0.65	5.90±0.08
9	16.37±1.59	28.83±2.48	1.54±0.12	18.72±0.21	10.69±1.13	16.55±1.54	27.23±2.67	7.65±0.48	6.29±0.05
10	14.47±1.11	21.24±2.48	1.48±0.11	14.35±0.60	13.12±1.23	15.37±0.53	28.49±1.77	6.17±0.66	6.37±0.03
11	13.65±1.01	39.45±2.47	1.45±0.10	27.20±0.33	15.63±1.19	11.77±1.51	27.40±2.71	6.79±0.64	6.08±0.03
12	12.60±1.51	23.52±2.73	1.37±0.11	17.16±0.71	14.06±1.51	9.20±0.73	23.26±2.25	6.52±0.68	6.43±0.03
13	12.49±1.61	32.62±2.46	1.42±0.10	22.97±0.02	16.44±1.48	12.76±1.37	29.21±2.85	6.97±0.51	5.92±0.08
14	10.58±1.06	33.38±1.36	1.35±0.10	24.72±0.89	11.96±1.18	10.88±0.97	22.84±2.15	5.23±0.57	6.21±0.02
15	10.41±0.91	30.00±2.73	1.31±0.10	22.90±0.37	11.65±1.14	11.72±1.13	23.37±2.26	5.88±0.56	5.98±0.05
16	9.44±0.78	25.79±2.48	1.27±0.10	20.31±0.43	12.37±1.24	8.46±0.89	20.83±2.13	5.73±0.40	6.43±0.02
17	7.14±0.58	22.76±2.55	1.20±0.09	18.96±0.71	13.02±1.20	8.14±0.84	21.16±2.04	4.14±0.42	6.49±0.03
18	6.19±0.54	21.24±2.48	1.23±0.09	17.27±0.72	11.80±1.25	9.03±0.92	20.84±2.17	4.33±0.41	6.54±0.05
19	5.52±0.73	28.83±2.45	1.24±0.09	23.25±0.26	14.45±0.98	5.61±0.86	20.06±1.83	4.16±0.41	5.98±0.04
20	4.43±0.58	24.27±2.31	1.18±0.09	20.57±0.56	14.77±1.15	6.14±0.98	20.91±2.13	3.24±0.32	5.97±0.03
A	16.64±1.29	37.68±2.76	1.45±0.11	25.24±0.47	13.07±1.23	17.75±1.39	30.82±2.61	7.82±0.68	6.09±0.05

注: UA 为土壤的脲酶活性, OM 为有机质含量, SN 为总氮含量, MN 为无机氮含量, Bacteria 为脲酶活性细菌数量, 下同。α=0.05。

表2 土壤化学性质和土壤脲酶活性的相关性

Tab. 2 Correlations between soil chemical property and urease activity

因素	UA	OM	SN	C/N	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	MN	Bacteria
OM	0.747**							
SN	0.985**	0.758**						
C/N	0.624**	0.963**	0.624**					
NH ₄ ⁺ -N	-0.114	0.029	-0.086	0.092				
NO ₃ ⁻ -N	0.914**	0.751**	0.914**	0.638**	-0.167			
MN	0.862**	0.750**	0.856**	0.653**	0.060	0.958**		
Bacteria	0.976**	0.791**	0.977**	0.662**	-0.095	0.916**	0.869**	
pH	-0.606	-0.735	-0.650	-0.687	-0.266	-0.568	-0.630	-0.645

注: 斯皮尔曼相关系数, **表示显著性水平 α=0.01。

表3 土壤性质对土壤脲酶活性的通径系数

Tab. 3 Path way coefficients of soil properties about soil urease activities

因素	OM	SN	C/N	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	MN	Bacteria	pH	r
OM		0.181**	0.753**	0.039	0.368	-0.302	0.058	0.009	1.755**
SN	4.442**		-3.385**	-0.365	-3.114	2.864	-0.119	-0.081	-0.105
C/N	1.307**	-0.240**		-0.060	-0.562	0.482	-0.068	-0.017	-1.370**
NH ₄ ⁺ -N	0.339	-0.129	-0.301		-8.648**	8.626**	0.046	-0.067	-0.506
NO ₃ ⁻ -N	0.042	-0.014	-0.037	-0.113**		0.996**	0.006	-0.007	-4.324
MN	-0.035	0.013	0.032	0.114**	1.002**		-0.006	0.007	4.071
Bacteria	3.116	-0.008	-0.265	-2.143	0.286	2.833		-2.754	0.835**
pH	2.005	-0.727	-2.106	-1.705	-12.813	12.817	-0.032		-0.056

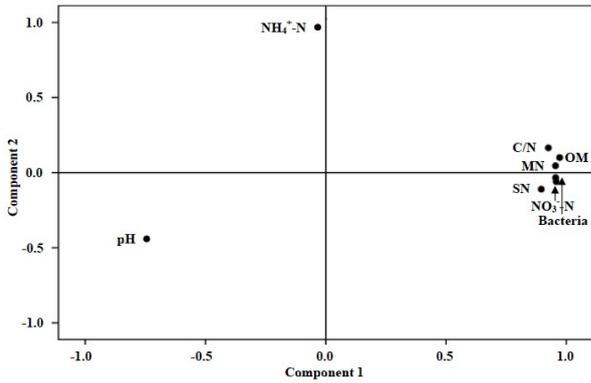


图 1 脲酶活性关联因子的因子载荷图

Fig. 1 Component plot in rotated space of effective factor

主成分分析结果见图 1。由图 1 可知，土壤有机质含量、总氮含量、C/N、硝酸根离子浓度、无机氮含量、土壤脲酶活性细菌数量和土壤 pH 在第一公因子（图 1 中第一、四象限）上有较大的载荷，其中土壤有机质含量、总氮含量、C/N、硝酸根离子浓度、无机氮含量和土壤脲酶活性细菌数量为正载荷，土壤 pH 为负载荷；铵根离子浓度在第二公因子（图 1 中第二象限）上有较大的正载荷。结果说明可以把有机质含量等 7 个土壤脲酶活性关联因子综合成 2 类因素，第 1 类（图 1 中第一、四象限）是脲酶活性控制因素，包括土壤有机质含量、总氮含量、C/N、硝酸根离子浓度、无机氮、

土壤 pH 和土壤脲酶活性细菌数量等，这类因素直接影响土壤脲酶的活性；第 2 类（图 1 中第二象限）是反馈作用因素，即铵离子浓度，这类因素主要影响尿素和铵离子的动态平衡，通过反馈作用影响土壤脲酶活性。

2.2 土壤脲酶活性细菌系统发育分析

采用 16S rRNA 序列分析的方法对土壤脲酶活性细菌进行初步鉴定。试验分离出土壤脲酶活性细菌分属于厚壁菌门（Firmicutes）和变形菌门（Proteobacteria）2 大类群。厚壁菌门发现杆菌属（*Bacillus*）、芽孢八叠球菌属（*Sporosarcina*）和芽孢杆菌属（*Lysinibacillus*）3 属，其中杆菌属（*Bacillus*）有 2 种，分别是海滨芽孢杆菌（*B. litoralis*）、芽孢杆菌（*B. tequilensis*）；芽孢杆菌属（*Lysinibacillus*）有 4 种，分别是梭形芽孢杆菌（*L. fusiformis*）、*L. macroides*、*L. parviboronicapiens*、*L. xylanilyticus*；芽孢八叠球菌属（*Sporosarcina*）有 1 种是八叠球菌（*S. pasteurii*）。变形菌门发现产碱杆菌属（*Alcaligenes*）和假单胞菌属（*Pseudomonas*）2 个属，都是单属单种，分别是粪产碱杆菌（*A. faecalis*）和绿脓假单胞菌（*P. aeruginosa*）（图 2）。结果显示土壤脲酶活性细菌优势类群是厚壁菌门，间或分布变形菌门菌株，具有明显的特异性。

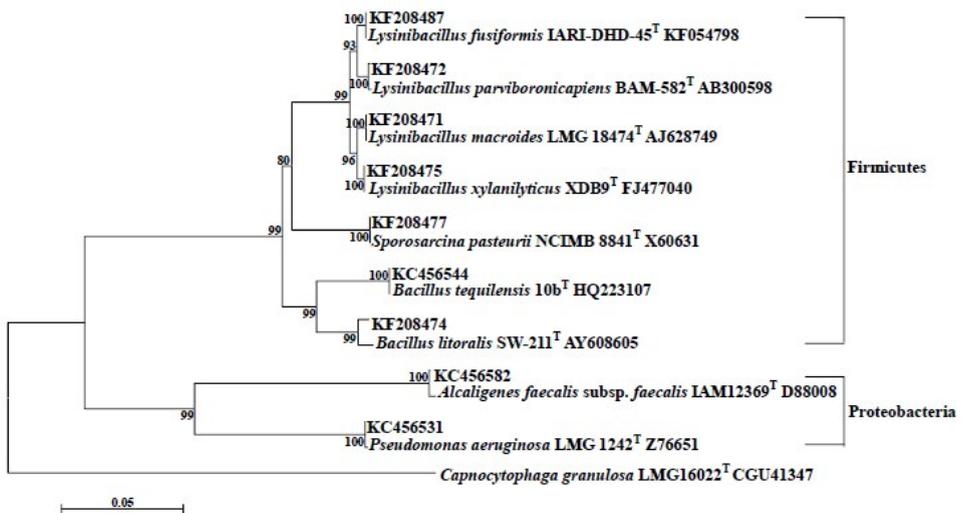


图 2 土壤中可分离脲酶活性细菌的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of cultural urease-active bacteria in soil

2.3 3 种材料脲酶活性细菌的特点

采用 16S rRNA 序列分析的方法对脲酶活性细

菌进行初步鉴定，脲酶活性细菌菌株信息见表 4。在土壤关联的脲酶活性材料（取自土壤取样地的

沼气渣、动物粪便、农家肥和淤泥) 中发现 9 种脲酶活性细菌, 其中放线菌门细菌 1 种, 为谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*); 厚壁菌门细菌 2 种, 分别为科氏葡萄球菌 (*Staphylococcus cohnii*) 和木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*); 变形菌门是土壤关联材料的优势种群, 共分离出粪产碱杆菌、奥斯陆莫拉菌 (*Moraxella osloensis*) 和绿

脓假单胞菌等 6 种。与之相比, 土壤中未发现放线菌门细菌, 厚壁菌门是土壤脲酶细菌的优势种群, 分离出细菌海滨芽胞杆菌和芽孢杆菌等 7 种, 但活性材料中的科氏葡萄球菌和木糖葡萄球菌并未发现, 土壤中仅发现变形菌门的粪产碱杆菌和绿脓假单胞菌 2 种细菌。

表 4 脲酶活性菌株信息统计表

Tab. 4 Basic message of urease active bacteria

门	菌株种类和编号	序列号	相似性 (SI)/%	供试材料		
				土壤	土壤关联材料	土壤无关材料
放线菌门 (Actinobacteria)	<i>Arthrobacter creatinolyticus</i> ALK631	KC456596	99.56	-	-	+
	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> ALK041	KC456536	99.49	-	-	+
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ALK415	KC456545	98.94	-	+	-
	<i>Kocuria marina</i> ALK012	KC456518	99.02	-	-	+
拟杆菌门 (Bacteroidetes)	<i>Myroides marinus</i> ALK427	KC456556	99.35	-	-	+
	<i>Bacillus litoralis</i> fwzy4	KF208474	99.17	+	-	-
厚壁菌门 (Firmicutes)	<i>Bacillus tequilensis</i> ALK414	KC456544	99.91	+	-	-
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> fwzb5	KF208487	99.86	+	-	-
	<i>Lysinibacillus macroides</i> fwzy1	KF208471	99.79	+	-	-
	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i> fwzy2	KF208472	99.57	+	-	-
	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> fwzy21	KF208475	99.85	+	-	-
	<i>Sporosarcina pasteurii</i> fwzy14	KF208477	99.41	+	-	-
	<i>Staphylococcus cohnii</i> ALK007	KC456513	99.03	-	+	+
	<i>Staphylococcus xylosus</i> ALK625	KC456590	99.24	-	+	+
	<i>Alcaligenes faecalis</i> ALK513	KC456582	98.88	+	+	+
	<i>Klebsiella oxytoca</i> ALK033	KC456572	99.16	-	-	+
	<i>Moraxella osloensis</i> ALK412	KC456542	99.14	-	+	-
	<i>Morganella morganii</i> ALK031	KC456521	99.78	-	+	+
	变形菌门 (Proteobacteria)	<i>Proteus mirabilis</i> ALK428	KC456557	99.31	-	-
<i>Proteus penneri</i> ALK515		KC456568	99.34	-	-	+
<i>Proteus vulgaris</i> ALK037		KC456524	99.30	-	-	+
<i>Providencia rettgeri</i> ALK417		KC456547	99.58	-	-	+
<i>Providencia vermicola</i> ALK059		KC456565	99.30	-	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ALK316		KC456531	99.16	+	+	+
<i>Raoultella ornithinolytica</i> ALK014		KC456520	99.23	-	+	-

注: “+”表示在该供试材料中分离到该菌种的菌,“-”表示未分离到该菌种的菌。

土壤无关联脲酶活性材料(来源于南海北部和印度洋沿海红树林的海底淤泥及圆通山动物园的不同种类的珍稀动物粪便)中分离出 *Arthrobacter creatinolyticus*、成晶节杆菌 (*A. crystallopoietes*) 和考克氏菌 (*Kocuria marina*)、*Myroides marinus*、科氏葡萄球菌和木糖葡萄球菌、粪产碱杆菌、产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytoca*)、摩氏摩根菌 (*Morganella mor-*

ganii)、奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*)、羽状变形菌 (*P. penneri*)、普通变形杆菌 (*P. vulgaris*)、雷氏普罗威登斯菌 (*Providencia rettgeri*)、普罗威登斯菌 (*P. vermicola*) 和绿脓杆菌 10 属 15 种脲酶活性细菌, 分属于放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和变形菌门 (Proteobacteria) 4 个类群。

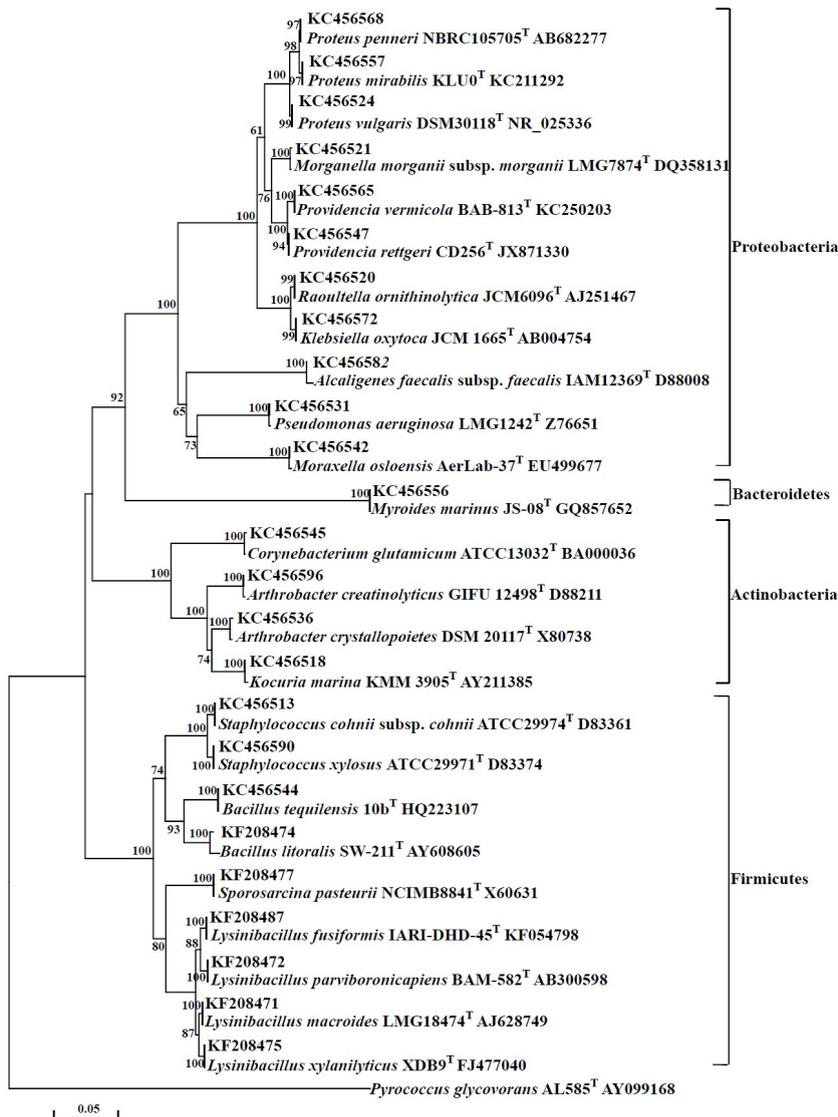


图 3 纯培养细菌 16 属的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of cultural urease-active bacteria in 16 genera

2.4 脲酶活性细菌的系统发育分析

采用 16S rRNA 序列分析的方法对脲酶活性细菌进行初步鉴定。发现脲酶活性细菌的分属情况 (图 3) 是, (1) 放线菌门 (Actinobacteria) 分布 3 属 4 种, 分别是棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*) 和 考克氏菌属 (*Kocuria*), 其中节杆菌属有 *A. creatinolyticus* 和 成晶节杆菌 (*A. crystallopoietes*), 棒状杆菌属 (*Corynebacterium*) 有谷氨酸棒杆菌 (*C. glutamicum*), 考克氏菌属 (*Kocuria*) 有考克氏菌 (*K. marina*); (2) 拟杆菌门 (Bacteroidetes) 仅有 1 属 1 种, 是 *Myroides marinus*; (3) 厚壁菌门 (Firmicutes) 分布 4 属 9 种, 分别是芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、芽孢八叠球菌属 和梭杆菌属 (*Lysiniba-*

cillus) 4 属, 其中芽孢杆菌属有 2 种, 是海滨芽孢杆菌 (*B. litoralis*)、芽孢杆菌 (*B. tequilensis*), 梭杆菌属 (*Lysinibacillus*) 有 4 种, 分别是 *L. fusiformis*、*L. macroides*、*L. parviboronicapiens*、*L. xylanilyticus*, 葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 有 2 种, 分别是科氏葡萄球菌 (*S. cohnii*)、木糖葡萄球菌 (*S. xylosus*), 芽孢八叠球菌属有 1 种, 是八叠球菌; (4) 变形菌门 (Proteobacteria) 有 8 属 11 种, 分别是变形杆菌属 (*Proteus*)、摩根氏菌属 (*Morganella*)、普罗维登斯菌属 (*Providencia*)、拉乌尔菌属 (*Raoultella*)、克雷白氏杆菌属 (*Klebsiella*)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)、假单胞菌属和莫拉克斯氏菌属 (*Moraxella*) 8 属, 变形杆菌属有奇异变形杆菌 (*P. mirabilis*)、羽状变形菌、普通变形杆菌 3 种, 摩根氏菌属

(*Morganella*) 有摩氏摩根菌 (*M. morganii*) 1种, 普罗维登斯菌属 (*Providencia*) 有雷氏普罗威登斯菌 (*P. rettgeri*)、普罗威登斯菌 (*P. vermicola*) 2种, 拉乌尔菌属 (*Raoultella*) 分布解鸟氨酸拉乌尔菌 (*R. ornithinolytica*) 1种, 克雷白氏杆菌属 (*Klebsiella*) 有产酸克雷伯菌 (*K. oxytoca*) 1种, 产碱杆菌属有粪产碱杆菌 1种, 假单胞菌属有绿脓假单胞菌 1种。结果显示脲酶活性细菌多数分属变形菌门 (Proteobacteria), 分布跨度巨大, 分属于 4 门 16 属, 且单属单种现象明显。

3 结论与讨论

引入土壤脲酶活性细菌分析土壤脲酶活性因素发现, 脲酶活性细菌、有机质、总氮、C/N、硝酸根离子、无机氮含量和土壤脲酶活性间具有极显著阳性相关性。脲酶活性细菌是产生脲酶的一类重要微生物, 直接关系土壤脲酶的性质和数量^[18]。土壤 C 和 N 是微生物的发酵底物, 影响土壤微生物的种类和数量^[19], C/N 影响微生物的生长速度^[20], 进而影响土壤脲酶的性质和数量。另外, 有机质分解产生的腐殖质能够固定脲酶, 增加脲酶的稳定性^[21], 也可以影响脲酶活性。主成分和通径分析结果显示上述土壤脲酶活性关联因子可以分为两类, 一类是脲酶活性控制因素, 另一类是反馈作用因素。同时通径分析发现土壤有机质、C/N 和土壤脲酶活性细菌是直接作用因素, 其余则是间接作用因素。

土壤脲酶活性细菌在尿素氮循环中扮演了重要角色。本研究分离和初步鉴定了 20 份土壤样品的脲酶活性细菌, 共发现 5 属 9 种细菌具有脲酶活性, 相比较文献中已发现的土壤脲酶活性细菌^[22-24], 本实验结果具有较低多样性。这可能是因为研究取样范围狭窄以及分离、人工培养的方式对于微生物具有极强的选择性^[19], 因此, 要准确地阐述土壤脲酶活性细菌的多样性, 需要在更为宽泛的尺度进行非培养法 (宏基因组或酶切图谱分析) 的测试。

脲酶活性细菌在自然界中是丰富多样的, 目前已经发现的脲酶活性细菌有内氏放线菌 (*Actinomyces naeslundii*)、产气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*)、

巨大芽胞杆菌 (*Bacillus megaterium*)、支气管波氏杆菌 (*Bordatella bronchiseptica*)、*Dactylosporangium aurantiacum*、小球菌 (*Micrococcus cerficans*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti*)、反刍月形单胞菌 (*Selenomonas ruminantium*)、桃红荚硫菌 (*Thiocapsa roseopersicina*)、支气管分枝杆菌 (*Mycobacterium bronchiseptica*)、耶尔森氏假结核病菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 和鼠疫耶尔森菌 (*Y. Pestis*) 等 43 个物种^[22-29]。本实验共计发现 4 门 16 属 26 种细菌具有脲酶活性, 其中以变形菌门为优势类群, 有 8 属 11 种; 其次是厚壁菌门 4 属 9 种; 再次是放线菌门 3 属 4 种; 最后是拟杆菌门 1 属 1 种。研究发现的脲酶细菌和已报道的脲酶活性细菌多数不一样, 结果证明脲酶活性细菌具有高度多样性。

通过比较不同材料中的脲酶活性细菌发现: 样地内土壤关联脲酶活性材料的优势种群是变形菌门, 而土壤脲酶细菌的优势种群是厚壁菌门, 土壤中的脲酶活性菌株和土壤关联材料中的脲酶活性菌株具有明显的种类差异性, 仅变形菌门菌株粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*) 和绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 能够在 2 类分离材料中发现。农业上常用沼气渣、动物粪便、农家肥和淤泥作为肥料施入土壤中, 本实验样品采集地长期利用以上物质进行施肥, 然而本实验结果发现农民长期使用的这些有机肥与施加后的土壤所含脲酶细菌种类上有较大差异。这可能是由于土壤相较有机质而言具有抑菌作用, 营养贫瘠的特点^[30], 外源施加的细菌难以长期定殖。而厚壁菌门菌株不光具有厚壁保护, 也能形成芽孢, 具有极强的抗逆性, 在其适应土壤生态环境中发挥极重要的作用^[31]。

综上所述, 土壤脲酶活性细菌直接影响土壤脲酶活性, 且脲酶细菌在自然界中多样性丰富。然而由于土壤是一个稳定的生态系统, 稳定的生态系统对于外来生物具有排斥性, 想通过外来生物对土壤环境起到持续的干扰作用, 只有创造新的生态系统动态平衡才能实现^[32-33]。因此, 外源施用菌剂的方式调控土壤脲酶活性, 要么增加系统干扰能力, 创造一个新的动态平衡才能实现, 要么通过保护和调控本土微生物维持一个健康的动态才能成功。

参考文献:

- [1] Zantua M I, Bremner J M. Soil Urease Activity of Sundarban Mangrove Ecosystem, India[J]. *Advances in Microbiology*, 2017, 7(8): 617-632.
- [2] Bachmeier K L, Williams A E, Warmington J R, *et al.* Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation[J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 93(2): 171-181.
- [3] 高喜, 曹建华, 程阳, 等. 绿肥种植对石灰土脲酶活性与土壤肥力的影响[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(31): 13725-13728.
- [4] 康莉, 周文生, 侯翠红. 脲酶抑制剂的研究综述[J]. *河南化工*, 2009, 26(2): 8-10.
- [5] 焦晓光, 隋跃宇, 张兴义, 等. 土壤有机质含量与土壤脲酶活性关系的研究[J]. *农业系统科学与综合研究*, 2008, 24(4): 12-14.
- [6] 安韶山, 黄懿梅, 郑粉莉. 黄土丘陵区草地土壤脲酶活性特征及其与土壤性质的关系[J]. *草地学报*, 2005, 13(3): 233-237.
- [7] 向仕敏, 陆梅, 徐柳斌, 等. 5种林分类型林地土壤氮含量与其土壤微生物学性质的研究[J]. *西部林业科学*, 2008, 37(1): 41-45.
- [8] 司海丽. 几种农业废弃物好氧发酵产物的性状及田间应用效果研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2014.
- [9] 黄娟, 李槿, 张健. 改良靛酚蓝比色法测土壤脲酶活性[J]. *土木建筑与环境工程*, 2012, 34(1): 102-107.
- [10] 袁静, 季平扬, 袁艺. 修正的凯氏法测定土壤中的总氮[J]. *环境科学与管理*, 2009, 34(2): 143-146.
- [11] 苗艳芳, 李生秀, 扶艳艳, 等. 旱地土壤铵态氮和硝态氮累积特征及其与小麦产量的关系[J]. *应用生态学报*, 2014, 25(4): 1013-1021.
- [12] 郝国辉, 邵劲松. 土壤有机质含量测定方法的改进研究[J]. *农业资源与环境学报*, 2014, 31(2): 202-204.
- [13] 王媛华, 段增强, 董金龙, 等. 温室土壤酸化评估的不同pH测定方法比较研究[J]. *农业环境科学学报*, 2014, 33(11): 2164-2170.
- [14] 王元元. 丛枝菌根真菌在四川主要农田土壤中分布特点的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2005.
- [15] 程曼. 黄土丘陵区典型植物枯落物分解对土壤有机碳、氮转化及微生物多样性的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [16] Sipos R, Székely A J, Palatinszky M, *et al.* Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 60(2): 341-350.
- [17] Sung C H, Chae S H, Im W T, *et al.* *Myroides marinus* sp. nov., a member of the family Flavobacteriaceae, isolated from seawater[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(4): 938-941.
- [18] Farshid N, Carlos M M. Effects of soil properties and trace metals on urease activities of calcareous soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2004, 40: 359-362.
- [19] Liu Q H, Shao T, Zhang J G. Determination of aerobic deterioration of corn stalk silage caused by aerobic bacteria[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2013, 183(3): 124-131.
- [20] Chiarini L, Bevivino A, Dalmastri C, *et al.* Burkholderia cepacia complex species: health hazards and biotechnological potential[J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(6): 277-286.
- [21] Oka Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments - a review[J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 44: 101-115.
- [22] 彭仁, 邱业先, 汪金莲. 脲酶高产菌的筛选和产酶条件的研究[J]. *江西师范大学学报*, 2003, 27(3): 273-275.
- [23] Varennyam A, Xiangliang P. Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation[J]. *Current Microbiol*, 2011, 25(5): 127-128.
- [24] Li M, Cheng X H, Guo H X. Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 76: 81-85.
- [25] Kakimoto S, Okazaki K, Sakane T, *et al.* Isolation and taxonomic characterization of acid urease-producing bacteria[J]. *Agricultural and Biology Chemistry*, 1989, 53(4): 1-8.
- [26] Lauková A, Koniarová I. Survey of urease activity in ruminal bacteria isolated from domestic and wild ruminants[J]. *Microbiology*, 1995, 84(338): 7-11.
- [27] 赵圣国. 牛瘤胃脲酶基因多样性分析与脲酶活性调控[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [28] Ferrero R L, Hazell S L, Lee A. The urease enzymes of *Campylobacter pylori* and a related bacterium[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 1988, 27(1): 33-40.
- [29] Syed G, Dastager C K, Deepa A P, *et al.* Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(2): 259-265.
- [30] 潘玮, 穆常青, 蒋细良. 木霉的孢子与土壤抑菌作用[J]. *中国生物防治*, 2006, 22(2): 87-91.
- [31] Ogawa Y, Ooka T, Shi F, *et al.* The genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of Firmicutes and its intracellular adaptations[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 8(3): 120-124.
- [32] Anthony R I, Stephen R C. Stability and diversity of ecosystems[J]. *Science*, 2007, 317(58): 58-62.
- [33] Kevin S M. The diversity-stability debate[J]. *Nature*, 2000, 405: 228-233.