氮肥缺失对旱地土壤细菌群落多样性的影响

李 杨[1],岑 剑[1],王保莉[1,2],曲 东[3]
(1.西北农林科技大学生命科学学院,陕西 杨凌 712100;2.黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室,陕西 杨凌 712100;
3.西北农林科技大学资源环境学院,陕西 杨凌 712100)

摘 要:本文旨在研究氮肥缺失对旱地土壤细菌群落多样性的影响。采用直接提取土壤微生物总DNA的方法,对不施肥(CK)、适量施肥(F1)、和缺氮施肥(F2)3种不同施肥水平土样DNA进行提取,扩增细菌16S rDNA基因片段,建立克隆文库。用限制性内切酶 *Hha* I 和 *Rsa* I 进行PCR-RFLP分析,分别得到146、187、11个酶切类型。采用α多样性的测度对试验结果进行分析统计结果表明,不同处理间土壤细菌的多样性(H'、D_s 和 D_g)和物种丰富度(d_{Ma}、R_2 和 E)均为F1>CK>F2;λ、d_{Ma}、E 和 H' 指数在不同施肥处理间的变异系数达到56.96%~163.1%,尤其Simpson指数λ是非常敏感的指标,处理间的差异最大,表明氮肥缺失严重影响土壤细菌群落多样性,合理施肥有利于土壤细菌的多样性。

关键词:氮肥;旱地土壤;细菌多样性;RFLP;16S rDNA
中图分类号:Q938.1;S143;S154.3 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-7601(2009)02-0199-05

无机养分不足或供应不平衡,对土壤微生物群落的结构组成和多样性产生重要影响[1]。氮素是构成一切生命体的重要元素,也是农业上使用最多的肥料之一。很多学者认为氮肥对微生物量影响较大[2~5],也有研究发现无机氮并未增加土壤微生物碳、氮的含量[6,7]。Yang等[5]的研究显示,施碳酸氢铵可导致土壤DNA多样性减少。Lovell[7]发现长期施用无机氮肥可减少土壤微生物的活性。Sarathchandra等[8]却认为无机氮肥和磷肥对土壤微生物多样性无明显影响。由于肥料施用方式(施用量、长期施用或短期施用)、土壤类型和利用方式等因素的影响,使得施肥对土壤微生物多样性这一问题的相关报道结论不同。目前,针对氮肥对土壤微生物群落多样性影响的报道较少,特别是以黄土高原旱地土壤为对象的研究亟待加强。因此,本文拟以西北地区旱地土壤为研究对象,采用PCR-RFLP技术,以期初步探明氮肥与旱地土壤细菌多样性的关系,从而为合理施肥,避免生态破坏,改良农业环境提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

土壤样品于2006年10月采集于陕西杨凌西北农林科技大学农作一站收获后的大田,前茬作物为玉米。土壤类型为土垫旱耕人为土(Earth-cumuli-Orthic Anthrosols)。采集5~20 cm表层,自然风干,研磨,过3 mm土壤筛。取2.5 kg土壤装盆,种植小白菜以降低供试土壤肥力水平。40 d后取出土壤,风干,研磨,过1 mm土壤筛,备用。土壤有机质含量16.95 g/kg,全量氮、磷和钾分别为1.03、1.59和16.76 g/kg,NO_3^--N、NH_4^+-N、速效磷和速效钾分别为19.2、10.3、20.39和153.71 mg/kg。

1.2 试验处理

称取10.000 g风干土若干份,置于10 mL塑料离心管中。设置两种施肥水平:处理1(F1)为正常施肥量,处理2(F2)为氮肥缺失,以不施肥处理作为对照。正常施肥量分别按 $N:P_2O_5:K_2O$ 为0.2:0.15:0.3风干土设置,氮肥缺失不施氮肥,其余按正常施肥量处理。氮肥、磷肥和钾肥分别选用尿素、KH_2PO_4 和KCl。控制土壤水分为最大毛管持水量的80%,置于28℃恒温培养箱中避光培养15 d。每个处理设置3个平行。

1.3 土壤微生物总DNA提取

土壤微生物总DNA提取参考Zhou等[9]提出的方法并稍做修改。将培养后的土样取出,尽量混合均匀。称取0.300 g土样,加液氮充分研磨后提取,重复10次。将提取的DNA混合,采用0.8%琼脂糖凝胶电泳对其进行纯化,以除去腐殖酸等杂质。

收稿日期:2008-09-17
基金项目:黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室基金(10501-178)
作者简介:李 杨(1984-),女,硕士研究生,主要从事土壤微生物分子生态学研究。E-mail:liyang-1551@163.com。
通讯作者:王保莉(1960-),女,博士,教授。主要研究方向:分子生物学。E-mail:wbl@nwsuaf.edu.cn。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

于70 V电压下电泳30 min，切胶并用胶回收试剂盒回收。

1.4 细菌16S rDNA片段扩增与克隆文库构建

采用细菌16S rDNA通用引物对63F/1387R，引物序列为：5′-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3′和5′-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3′。以上述提取的土壤总DNA为模板，进行PCR。PCR扩增体系为：10×PCR缓冲液5 μl，1 mol/L dNTP 2.5 μl，引物各1 μl，Taq DNA聚合酶(5 U/μl)0.25 μl，DNA模板1 μl，ddH_2O补充体积至25 μl。重复10次，将PCR扩增产物混合，采用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测，胶回收试剂盒回收DNA。

将细菌16S rDNA扩增片段与pMD19—T载体进行连接反应，并转入大肠杆菌JM109中，通过蓝白斑筛选挑取阳性克隆子，建立土壤细菌16S rDNA克隆文库。

1.5 RFLP分析

通过菌落PCR方法，随机挑取约200个阳性克隆，用pMD19—T载体通用引物M13重新扩增插入的16S rDNA片段。向PCR产物中加入1/10倍体积3 mol/L NaAc及2倍体积预冷无水乙醇进行纯化，—20℃静置4 h，离心，70%乙醇洗涤沉淀2次，ddH_2O溶解DNA。将DNA分别用 *Hha* I 和 *Rsa* I 两种限制性内切酶消化（37℃，4 h）。酶切DNA片段用2%的琼脂糖凝胶电泳分离，经溴化乙锭染色和凝胶成像系统成像后，分析RFLP带型图谱。每一个带型作为一个分类操作单位(OTU，Operational Taxonomic Unit)。

1.6 多样性指数及统计分析方法

RFLP结果分析采用α多样性测度指标，包括Shannon—Wiener指数(H')、Simpson指数(λ和D_s)、Gini指数(D_g)等4种物种多样性指数[10,11]；物种丰富度指数(E)、Margalef指数(d_{Ma})和Menhinick指数(R_2)等3种物种丰富度指数[11,12]；基于Gini指数计算的Pielou指数(J_g)和种间相遇机率指数 *PIE* 表征的物种均匀度指数[11]。克隆文库的库容(C)按文献[13]中的方法计算。聚类分析以细菌分布之间的Bray-Curtis相异性测度系数为距离指标[14]，用非加权平均配对法(UPGA)在NTsys 2.10统计软件上进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 土壤总DNA提取

本试验采用直接提取法提取土壤总DNA，通过琼脂糖凝胶电泳将DNA与土壤中的腐殖酸等杂质分离，结果见图1。

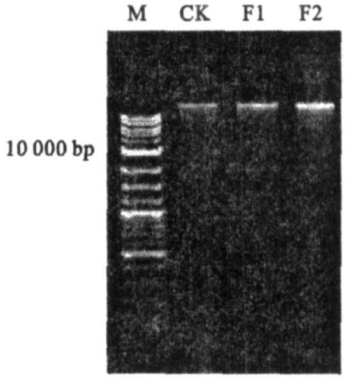

图1 土壤微生物总DNA的提取

Fig.1 Argarose gel eletrophoresis of total microbial DNA extracted from soil

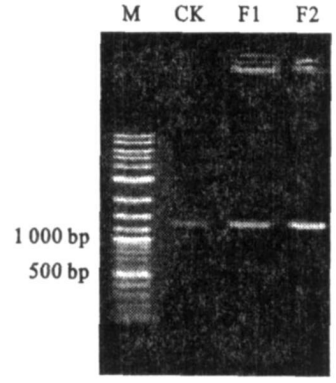

图2 16S rDNA基因扩增产物的电泳分析

Fig.2 Argarose gel eletrophoresis of PCR amplification of the 16S rDNA

2.2 细菌16S rDNA片段的扩增

以土壤微生物总DNA为模板，扩增出长度约为1 375 bp的片段，结果见图2。

2.3 克隆文库中16S rDNA片段的RFLP分析

每个处理随机挑取约200个阳性克隆进行菌落PCR，纯化后分别用 *Hha* I 和 *Rsa* I 消化，其部分酶切结果如图3和图4所示。克隆文库经 *Rsa* I 酶和 *Hha* I 酶切产生的RFLP类型统计结果见图5。3种施肥处理中，F1产生的酶切类型最多(187种)，CK为146种，F2最少(11种)。而出现一次的酶切类型，即单一克隆所占比例由多到少依次为F1(81.55%)、CK(74.73%)、F2(2.45%)。F2出现明显的优势菌种，所占比例分别为42.16%和40.69%。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

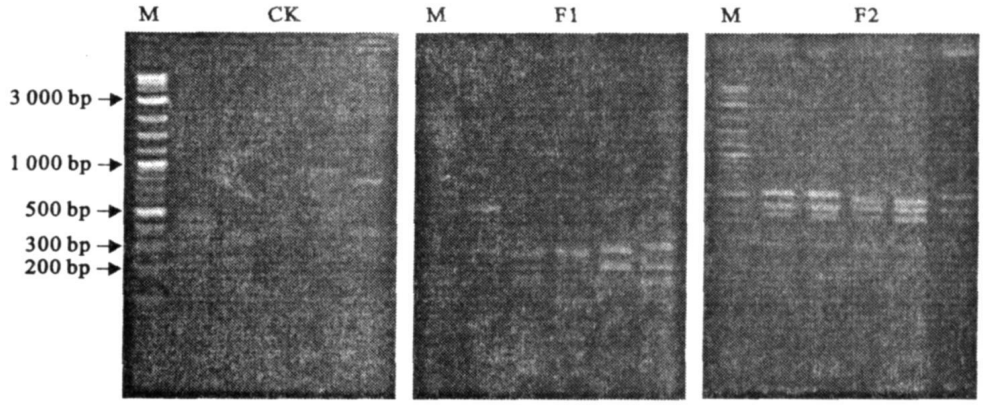

图 3　不同施肥处理土样中细菌 16S rDNA 的 *Rsa* I 部分酶切图谱

Fig. 3　Partial RFLP of soil bacterial 16S rDNA by *Rsa* I cleavage for different fertilizing treatments

M: DNA marker

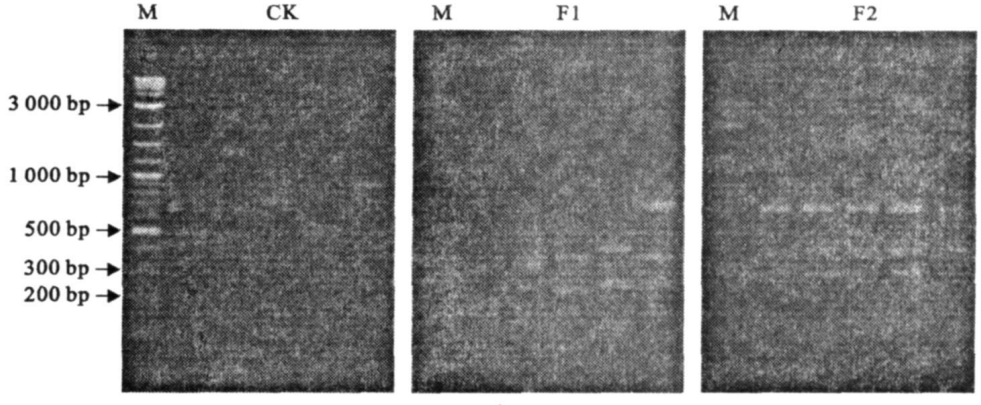

图 4　不同施肥处理土样中细菌 16S rDNA 的 *Hha* I 部分酶切图谱

Fig. 4　Partial RFLP of soil bacterial 16S rDNA by *Hha* I cleavage for different fertilizing treatments

M: DNA marker

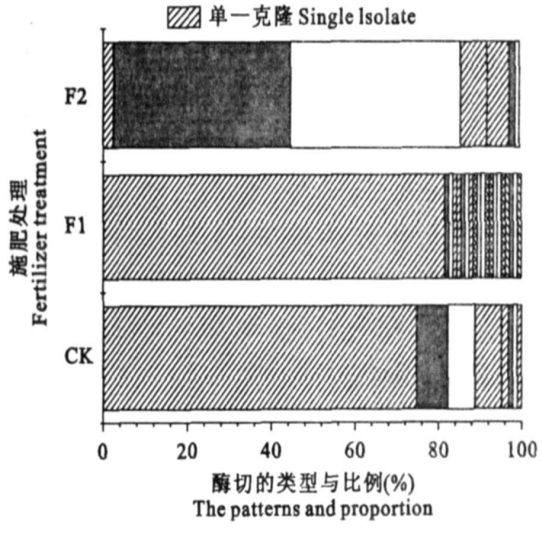

图 5　不同施肥处理土样细菌 16S rDNA 的 RFLP 统计结果

Fig. 5　Statistic results of RFLP of soil bacterial 16S rDNA for different fertilizing treatments

2.4　不同施肥处理的多样性指数比较

将上述试验得到的不同施肥处理土样细菌 16S rDNA 的 PCR－RFLP 结果换算为多样性指数,结果见表 1。从表 1 中可以看出,反映土壤细菌物种多样性的 H'(Shannon－Wiener), D_s(Simpson)和 D_g(Gini),以及度量物种丰富度的 d_{Ma}(Margalef), R_2(Menhinick)和 E 等 6 个指数数值上均为 F1＞CK＞F2,表明缺氮处理(F2)中细菌种群数最少,物种贫瘠,而正常施肥处理(F1)中细菌种群最多,物种丰富,反映出合理的施肥量有利于土壤中细菌种群的多样性。Simpson 指数(λ)的变化趋势则与上述指数相反,表现为 F2＞CK＞F1,说明不同施肥处理对细菌群落优势度有影响。在缺氮施肥处理下,土壤中的细菌种群优势度最明显,即有明显优势菌种的出现。反映细菌种群的 Pielou 均匀度指数 J_g 和 *PIE* 指种间机遇率的排序为 F1＞CK＞F2,这与表示多样性和丰富度的 6 个指数结果相同,说明氮肥缺失处理下土壤样品中细菌种类分布不均匀,正

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

常施肥下种类分布最均匀，构成功能体系较完善的细菌群落。

比较不同处理间多样性指数的变异系数(CV)可以看出，λ、d_{Ma}、E 和 H' 指数作为度量不同施肥处理土壤的细菌种群构成的参数，其差异比较显著，分别为163.1%、80.76%、79.29%和56.96%，其中不同处理间的 λ 的 CV 值最大，表明从细菌群落优势度的角度比较不同处理间的差异是本试验中最为敏感的指标。其他4种指标的CV分别在17.04%～22.40%之间，说明不同处理间的变化也很较显著。

表1 ^{16}S rDNA 克隆文库 PCR-RFLP 的多样性参数

Table 1 Diversity of restriction endonuclease types in ^{16}S rDNA clone library

处理 Treatments	S/N	C (%)	多样性指数 Diversity index								
			H'	λ	D_s	D_g	d_{Ma}	R_2	E	J_{gi}	PIE
CK	146/186	25.27	4.681	0.0133	0.9867	0.9813	27.75	10.71	0.7849	0.9881	0.9867
F1	187/206	18.45	5.233	0.0009	0.9991	0.9942	34.91	13.03	0.9078	0.9995	0.9991
F2	11/204	97.55	1.300	0.3480	0.6520	0.6493	1.880	9.312	0.0539	0.7143	0.6520
变异系数(CV%)	—	—	56.96	163.1	22.40	22.34	80.76	17.04	79.29	17.93	22.40

注：S 为 ^{16}S rDNA 的 RFLP 总类型数，N 为总克隆数。

Note: S means the number of RFLP pattern of ^{16}S rDNA, N means the total number of clone.

2.5 不同施肥处理的土壤类型分析

对 H'，λ，D_g，d_{Ma}，R_2，E，Jg 和 PIE 等8个多样性指数进行基于细菌多样性的土壤类型聚类分析，结果如图6。可以看出，对照与F1土壤细菌群落组成类型趋于一类，在聚类关系上趋同性强，而F2与CK和F1聚类关系很远，说明本试验条件下氮肥缺失导致土壤环境发生显著改变。

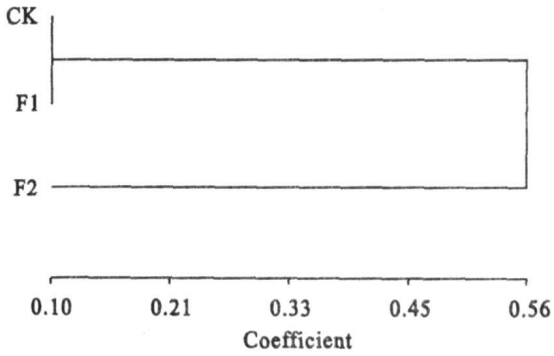

图6 三种施肥处理土壤聚类分析树状图

Fig.6 Distance matrix trees of soils from three kinds of fertilizing treatments

3 讨 论

采用土壤微生物总DNA直接提取法可避免传统培养法提取DNA时无法包含绝大多数的不可培养微生物的缺陷，更加全面地反映土壤微生物的多样性及丰度。通过琼脂糖凝胶电泳将DNA与土壤中腐殖酸等杂质进一步分离，避免了腐殖酸等对PCR过程的干扰，提高了PCR－RFLP技术的可靠性。

本文采用多种多样性指数模型对试验结果进行了分析，比较了不同模型在反映不同处理土壤中细菌群落多样性和种群分布时的敏感程度。从不同处理间的变异系数(CV)比较，λ、d_{Ma}、E 和 H' 指数在不同施肥处理间的差异为56.96%～163.1%，尤其是Simpson指数λ是非常敏感的指标。在国内相似的报道中，大多采用 Shannon-Wiener 指数 H'、Simpson 指数 D、Margalef 指数 d_{Ma}及均匀度指数 E 作为评价指标[13,15,16]，本文增加了 Simpson 指数 λ、Menhinick 指数 R_2、Gini 指数 D、物种丰富度指数 E 和种间机遇率指数 PIE，采用其中8种指数进行基于细菌多样性的土壤类型聚类分析，增加了聚类分析结果的可信度。在以上9种指数中，尽管 Simpson 指数 D 与 PIE 表征的统计学意义不同，但两者的计算结果一致[11]，因而在聚类分析中选择了8种参数。

磷钾肥处理的细菌群落结构与其他所有处理相比较显示出明显的差异，产生这种实验结果的原因，可能是氮肥作为一种土壤中的关键因子抵消了其他化肥对细菌群落结构的影响，这种作用是正面的还是负面的还有待进一步研究[17]。

本试验用RFLP技术和多指数分析，探讨了不同施肥处理对室内模拟培养条件下土壤样品中细菌分型的影响。从不同多样性指数及聚类分析结果比较看出，3种不同处理之间具有明显区别，其中氮肥缺失导致土壤细菌群落水平上的差异，显示出合理施肥量对保持土壤细菌群落稳定和多样性具有重要意义。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参 考 文 献:

[1] 张奇春, 王光火, 方斌. 不同施肥处理对水稻养分吸收和稻田土壤微生物生态特征的影响[J]. 土壤学报, 2005, 42(1): 116—121.

[2] 王继红, 刘景双, 于君宝. 氮磷肥对黑土玉米农田生态系统土壤微生物量碳、氮的影响[J]. 水土保持学报, 2004, 18(1): 35—38.

[3] 张海燕, 肖延华, 张旭东. 土壤微生物量作为土壤肥力指标的探讨[J]. 土壤通报, 2006, 37(3): 422—425.

[4] Fauci M F, Dick R P. Soil microbial dynamics: short and long-term effects of organic and inorganic nitrogen[J]. Sci Soc Am J, 1994, 58(3): 801—808.

[5] Yang Y H, Yao J, Hu S. Effects of agricultural chemicals on DNA sequence diversity of soil microbial community: a study with RAPD marker[J]. Microb Ecol, 2000, 39(1): 72—79.

[6] Glendining M J, Powlson D S, Poulton P R. The effects of longterm application of inorganic nitrogen fertilizer on soil nitrogen in the Broadbalk Wheat Experiment[J]. J Agri Sci, 1996, 127(3): 347—363.

[7] Lovell R D, Jarvis S C, Bardgett R D. Soil microbial biomass and activity in long-term grassland: effects of management change[J]. Soil Biol Biochem, 1995, 27: 969—975.

[8] Sarathchandra S U, Ghani A, Yeates G W. Effect of nitrogen and phosphate fertilisers on microbial and nematode diversity in pasture soils[J]. Soil Biol Biochem, 2001, 33(7): 953—964.

[9] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedjie J M. DNA recovery from soil of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316—322.

[10] Zhang W, Ki J S, Qian P Y. Microbial diversity in polluted harbor sediments: I: Bacterial community assessment based on four clone libraries of 16_S rDNA[J]. Estuary, Coastal and Shelf Science, 2008, 76(3): 668—681.

[11] 马克平, 倩影前. 生物多样性研究的原理与方法[M]. 北京: 中国科技出版社, 1994: 141—165.

[12] 田育红, 刘鸿雁. 草地景观生态研究的几个热点问题及其进展[J]. 应用生态学报, 2003, 14(3): 427—433.

[13] 滕齐辉, 曹　慧, 崔中利, 等. 太湖地区典型菜地土壤微生物 16S rDNA 的 PCR—RFLP 分析[J]. 生物多样性, 2006, 14(4): 345—351.

[14] 夏北成, Zhou J, Tiedje J M. 土壤细菌类克隆群落及其结构的生态学特征[J]. 生态学报, 2001, 21(4): 574—578.

[15] 王　英, 腾齐辉, 曹　慧, 等. 免耕水稻土壤中细菌多样性及其空间分布的研究[J]. 土壤学报, 2007, 44(1): 138—143.

[16] 吴展才, 余旭胜, 徐源泰. 采用分子生物学技术分析不同施肥土壤中细菌多样性[J]. 中国农业科学, 2005, 38(12): 2474—2480.

[17] Ge Y, Zhang J B, Zhang L M, et al. Long-term fertilization regimes affect bacterial community structure and diversity of an agricultural soil in Northern China[J]. Soils, 2008, 8(1): 43—50.

RFLP analysis on the impact of microbial diversity of dry land soils without nitrogenous fertilizer

LI Yang[1], CEN Jian[1], WANG Bao-li[1,2], QU Dong[3]

(1. *College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*;
2. *State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on Loess Plateau, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*;
3. *College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: The impact of the absence of nitrogenous fertilizer on bacterial diversity in soil had been explored in this study. Total genome DNA of soil microorganism was extracted by a direct method from three soil samples of different fertilizing treatment which are CK without fertilizer, F1 with proper fertilizer and F2 without nitrogenous fertilizer. The 16S rDNAs of the extracted DNA were amplified using bacterial universal primers and then set relevant clone libraries. Using PCR—RFLP based on restriction endonuclease *Rsa* I and *Hha* I, simultaneously, restriction endonuclease types of these samples were got as 146, 187 and 11 after counting. All the data was analyzed by α diversity measurement indices, which showed the identical order of diversity (H', D_s and D_g) and richness (d_{Ma}, R_2 and E) between different treatment as F1>CK>F2. The coefficient of variation of indices λ, d_{Ma}, E and H' between different soil samples is 56.96%～163.1%, especially for index λ, with the greatest sensitivity, had the biggest difference between three different soil samples, suggesting that the bacterial diversity in soil was influenced seriously under absence of nitrogenous fertilizer, and proper fertilizer was positive to them in contrast.

Key words: nitrogenous fertilizer; dry land soil; bacterial diversity; RFLP; 16S rDNA

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net