

# 氮肥形态对香蕉种植土壤中氨氧化细菌与古菌的影响<sup>①</sup>

魏天娇<sup>1</sup>, 魏志军<sup>1</sup>, 陈 鹏<sup>1</sup>, 阮云泽<sup>2</sup>, 朱毅勇<sup>1\*</sup>

(1 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 2 海南大学农学院, 海口 570228)

**摘要:** 氨氧化微生物通过影响氮素在土壤中的转化而间接影响作物对不同氮素形态的吸收。因此, 本实验采集了海南省种植香蕉的滨海土壤, 通过施用硫酸铵和硝酸钙, 研究了氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)的数量与群落的变化, 并测定了香蕉的生长与氮营养状况。通过构建氨氧化细菌和古菌的功能基因 *amoA* 文库后发现: 施用硫酸铵的土壤中 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数显著高于施用硝酸钙的土壤和不施肥的土壤, 而 AOA 的拷贝数低于硝酸钙与不施肥处理。但是氨氧化古菌 AOA 的绝对数量都高于 AOB。施用硫酸铵的土壤中 AOB 的群落多样性和丰富度明显增加, 而施用硝酸钙的土壤却没有发生显著变化。施用硫酸铵和硝酸钙的土壤中 AOA 群落结构相似, 但丰富度和多样性均高于不施肥处理。从施肥效果看, 相比硫酸铵, 硝酸钙显著提高了香蕉植株的生物量和全氮含量。上述结果表明, 在南方酸性土壤中 AOA 占优势, 虽然施用铵态氮肥可以促进 AOB 的丰度与多样性, 但是很可能会抑制 AOA 的数量。因此, 在海南滨海土中施用铵态氮肥后, 通过硝化作用以满足香蕉吸收硝态氮的需求达不到理想的效果, 应直接补充硝态氮肥来促进香蕉生长。

**关键词:** 香蕉; 氨氧化细菌; 氨氧化古菌; 硫酸铵; 硝酸钙

**中图分类号:** S145.9

植物吸收的无机氮主要是铵和硝两种形态<sup>[1-3]</sup>。氨氧化微生物可以将土壤中的铵转变为硝, 从而影响作物的氮素营养与生长<sup>[4-5]</sup>。因此, 土壤氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)的数量和多样性与氮肥之间的关系受到广泛的关注。有研究表明长期施用化学氮肥可能导致酸性土壤中 AOA 和 AOB 的数量减少<sup>[6]</sup>, 而在碱性土壤中, 氮肥施用显著改变了 AOB 的数量和群落组成, 但对 AOA 影响很小<sup>[7-9]</sup>。也有研究发现酸性淋溶土壤中, 长期施用氮肥会增加 AOB 的数量, 但 AOA 数量呈下降趋势<sup>[10]</sup>。由于我国地域辽阔, 土壤类型丰富, 种植模式多样, 因此施用氮肥后对氨氧化微生物的影响还需要进行针对性的调查与研究。

香蕉是海南省最重要的经济作物, 种植面积达到百万亩之多<sup>[11]</sup>。香蕉属于多年生草本植物, 由于个体巨大, 栽培周期长, 对氮肥的需求量很大, 通常一株香蕉一年需要纯氮 500 ~ 800 g<sup>[12]</sup>。我国的氮肥品种主要以铵态氮与酰胺态氮(尿素)为主, 而热带地区土壤主要呈酸性反应, 导致硝化作用微弱, 容易在土壤

中积累铵, 对植物、微生物都可能造成一定的生理胁迫, 严重时还会形成连作障碍<sup>[13]</sup>。因此, 海南地区目前也在推广使用硝基氮肥。虽然有关氮肥对海南香蕉种植土壤中总细菌和真菌群落结构的影响已有所报导<sup>[14]</sup>, 但是针对氨氧化功能微生物的报道很少。因此本实验研究了不同氮肥形态对香蕉种植土壤中 AOA 和 AOB 的数量、群落结构和丰度等特征, 同时也为香蕉种植中合理施用不同形态氮肥提供理论参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

香蕉苗取自海南省(巴西品种 *Musa AAA Cavendish* subgroup cv. *Brazil*), 供试土壤采自海南省乐东县, 成土母质为滨海沉积物。采样深度为 0 ~ 20 cm 的表层土, 多点采样后混合, 过 5 mm 筛后装盆, 每盆装土壤 30 kg。定植一株香蕉苗后, 处理一施加硫酸铵 7.07 g, 处理二施加四水合硝酸钙 12.6 g, 折合纯氮 1.5 g, 对照处理 CK 不施氮肥, 重复 3 次。香蕉定植

基金项目: 教育部新世纪优秀人才项目(NCET - 11 - 0672)资助。

\* 通讯作者(yiyong1973@njau.edu.cn)

作者简介: 魏天娇(1992—), 女, 吉林公主岭人, 硕士研究生, 主要研究方向为植物营养与施肥。E-mail: 2012103158@njau.edu.cn

后每月施用一次氮肥,用量同上,总计 3 次。3 个月 后采集盆栽的土壤样品,充分混合后过 5 mm 筛,用于提取土壤 DNA。

## 1.2 土壤微生物总 DNA 的提取

称取 0.5 g 土壤,采用 mpbio 公司的 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit For Soil 试剂盒进行土壤微生物总 DNA 的提取。AOA 和 AOB 的 *amoA* 扩增体系为 2×PCR Mix 25 μl,正反引物各 0.2 mmol/L,2 μl DNA 模板,ddH<sub>2</sub>O 补充至 50 μl。AOB 的 *amoA* 引物 amoA-1F :GGGGTT-TCTACTGGTGGT;amoA-2R :CCCCTCGAAAGCC-TTCTTC。AOA 的 *amoA* 引物 Arch-amoA-F :STAAT-GGTCTGGCTTAGACG;Arch-amoA-R :GCCGCCA-TCCATCTGTATGT。反应程序分别为 95℃ 5 min,95℃ 45 s,55℃ 45 s,35 个循环;72℃ 1 min,72℃ 10 min,94℃ 3 min,94℃ 1 min,50℃ 1 min,35 个循环;72℃ 2 min,72℃ 3 min<sup>[15-16]</sup>。

## 1.3 目的片段的克隆和测序

使用 AxyPrep DNA 纯化试剂盒对 PCR 产物进行切胶回收纯化。将得到的 PCR 产物与 PMD19-T 载体进行酶连反应。对回收产物构建克隆文库(未采用真重复),挑取克隆子,并用 M13F 和 M13R 引物 PCR 筛选含目的片段的阳性克隆子后测序。

## 1.4 序列的多样性分析与发育树的构建

将测序结果利用 Mega 5.05 软件进行编辑,去除载体序列后得到目的序列。再用 mothur 软件以 98% 的同源性分析每个文库的多样性指数和 OTU 聚类分析:将所得到的 OTU 代表序列在 GenBank 进行 blast 比对,获得同源性较高的序列和菌种信息,并加入已知标准菌株的序列,最后通过 Clustal W 和 Mega 5.05 中的邻接法(Neighbor-joining)构建系统发育树。

## 1.5 荧光定量 PCR

定量 PCR 使用 SYBR Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒 (TaKaRa)。反应体系(25 μl):2×SYBR Premix Ex Taq 12.5 μl,上下游特异性引物各 0.5 μl,模板 1 μl,ROX I 1 μl。荧光 PCR 扩增过程:95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 35 s,共 40 个循环。分别以各靶基因的重组 PMD-19T 载体为标准质粒,计算出标准质粒的拷贝数,按 10 倍梯度稀释标准质粒为模板进行荧光定量 PCR 扩增,引物同 1.2。荧光 PCR 扩增条件:95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 34 s,共 40 个循环。每个样品 3 次重复,AOA 的 *amoA* 基因标线上拷贝数浓度是从  $4.6 \times 10^3 \sim 4.68 \times 10^{10}$  copies/μl,AOB 的 *amoA* 基因标线拷贝数浓度是从  $1.78 \times 10^2 \sim 1.12 \times 10^9$  copies/μl。

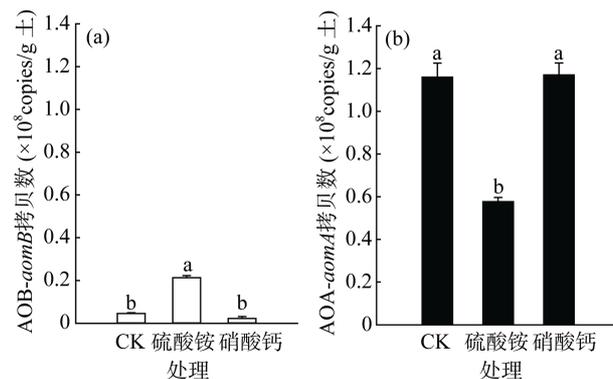
## 1.6 数据处理

所有方差分析和相关性分析都在 SPSS Statistics 20.0 软件中进行处理。测序结果都通过 mothur 软件基于 OTU 水平进行分析。其中氨氧化微生物群落组成的丰富度和多样性指数按照 mothur 软件自身的  $\alpha$ -diversity 操作流程进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 氮素形态对氨氧化细菌和氨氧化古菌 *amoA* 丰度的影响

本试验中测定到的 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数范围在  $1.72 \times 10^6 \sim 2.08 \times 10^7$  之间(图 1a),而 AOA 的 *amoA* 基因丰度在  $5.57 \times 10^7 \sim 1.21 \times 10^8$  之间(图 1b),从总体上看,土壤中 AOB 的数量低于 AOA,这说明在滨海土中 AOA 数量占优势。AOB 的 *amoA* 丰度受硫酸铵施用的影响而明显增加,而硝酸钙施用并没有增加土壤中的 AOB 数量。而 AOA 的 *amoA* 基因的丰度受硫酸铵处理的影响明显低于对照 CK,这说明铵态氮对 AOA 的生长有抑制作用。而硝态氮肥处理既没有促进也没有抑制 AOA 的数量。



(图中小写字母不同表示处理间差异达到  $P < 0.05$  显著水平)

图 1 不同氮肥处理下香蕉土壤 AOB 和 AOA 的 *amoA* 基因丰度

Fig. 1 The abundances of AOB and AOA-*amoA* genes of banana soils under different nitrogen treatments

### 2.2 氮素形态对土壤中氨氧化细菌和氨氧化古菌的 *amoA* 基因多样性的影响

2.2.1 氮素形态对土壤中 AOB 和 AOA 的 *amoA* 基因克隆文库多样性分析 针对 CK、硫酸铵和硝酸钙 3 个处理,分别挑取 200 个阳性克隆子测序,得到 AOB 有效序列 588 条,AOA 有效序列 593 条。3 种处理在 98% 相似度下得到的 AOB 和 AOA 的克隆文库库容值分别为 81%~90%,87%~94%。库容值较大,文库覆盖度较高,文库具有较好代表性<sup>[17]</sup>。因

此本试验构建的 AOB 和 AOA 的 *amoA* 的克隆文库可以较好地代表土壤中 *amoA* 基因结构的多样性。

根据生物学上的不同相似度水平将序列划分到不同的操作分类单元(Operation taxonomy unit ,OTU) ,本研究是基于 98% 置信度的 OTU 水平对氨氧化细菌群落结构进行分析, ACE 和 Chao 指数反映了土壤氨氧化微生物群落结构的丰富度 ,Invisimpson 和 Shannon

指数反映的是群落结构的多样性。从表 1 可以看出硫酸铵处理的土壤中 AOB 丰富度指数和多样性指数最高, 其次是硝酸钙处理, 这表明铵态氮肥促进了土壤 AOB 的丰富度和多样性, 而硝态氮肥虽然也提高了 AOB 的丰富度, 但是没有显著改变 AOB 的多样性。硫酸铵处理和硝酸钙处理也提高了 AOA 的丰富度与多样性, 并且硫酸铵的效果比硝酸钙更加显著。

表 1 氮素形态对土壤 AOB 和 AOA 的 *amoA* 基因丰富度和多样性的影响  
Table 1 The effects of nitrogen form on AOB and AOA-*amoA* gene community richness and diversity in soil

微生物	处理	OTUs	丰富度指数		多样性指数	
			ACE	Chao	Invisimpson	Shannon
AOB	CK	35	106	59.4	4.6	2.4
	硫酸铵	49	403	259.0	14.2	3.0
	硝酸钙	47	364	109.0	5.2	2.4
AOA	CK	26	54	39.2	5.8	2.2
	硫酸铵	39	206	339.0	11.9	2.8
	硝酸钙	35	100	77.7	9.0	2.6

2.2.2 不同氮素形态下土壤 AOB 和 AOA 的 *amoA* 基因克隆文库群落结构分析 3 种处理下的 AOB 的 588 条 *amoA* 基因序列以 98% 相似度在 OTU 水平上进行划分, 总共得到 91 种 OTUs, 其中不施肥 CK 处理 35 种, 硫酸铵处理 49 种, 硝酸钙处理 47 种。

AOA 的 593 条 *amoA* 序列共划分了 64 种 OTUs, CK 处理 26 种, 硫酸铵 39 种, 硝酸钙 35 种。为了清楚看出群落结构分布, 分别选取了 3 种不同处理下 AOB 的 12 种主要 OTU(图 2a) ,AOA 的 10 种主要 OTU (图 2b)。

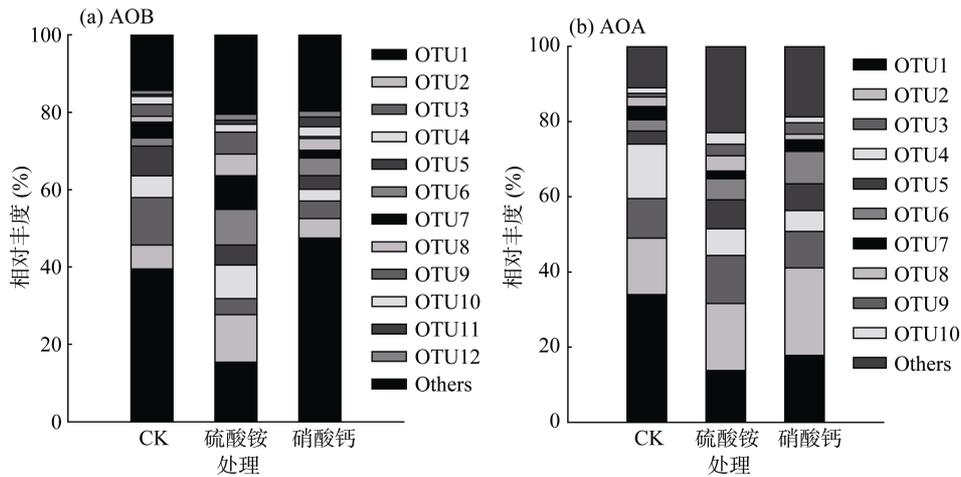


图 2 不同形态氮肥施用后土壤中 AOB 和 AOA *amoA* 基因的主要 OTU 的相对丰度  
Fig. 2 Relative abundances of main OTUs of soil AOB and AOA-*amoA* after application of different nitrogen forms

从图 2 中可以总体直观地看出参与氨氧化的主要 OTU 的结构分布情况和群落相似性。硫酸铵处理后的 AOB 的群落结构差异变化最为显著, 而硝酸钙处理和 CK 相比有一定的相似性, 但不是很显著。硫酸铵和硝酸钙处理后的 AOA 群落结构相似性较高, 并且与 CK 相比, 都对 AOA 群落结构产生了一定的影响。

以 OTU > 5% 定义为优势菌属, 则对照 CK 中 AOB 的优势菌属为 OTU1(39.4%), OTU2(6.1%), OTU3

(12.3%), OTU4(5.6%), OTU5(7.6%) 总共 5 种。硫酸铵处理后的 AOB 优势菌属为 OTU1(15.3%), OTU2 (12.3%), OTU3(4.1%), OTU4(8.7%), OTU5(5.1%), OTU6(9.2%), OTU7(8.7%), OTU8(5.6%), OTU9(5.6%) 共 9 种。硝酸钙处理后 AOB 优势菌属为 OTU1 (47.4%), OTU2(5.0%) 两种, 说明铵态氮肥改变了香蕉土壤 AOB 的优势菌属结构。

对于 AOA, 硫酸铵处理后的单一克隆出现比例最高的(12.7%), 其次是硝酸钙(9.6%), CK 最低(6%)。

对照 CK 中 AOA 的优势菌属为 OTU1(34%) , OTU2 (15%) , OTU3(10.5%) , OTU4(14.5%) , 共 4 种。硫酸铵处理后的 AOA 优势菌属为 OTU1(13.7%) , OTU2 (17.8%) , OTU3(12.7%) , OTU4(7.1%) , OTU5(7.6%) , OTU6(5.6%) , 共 6 种。硝酸钙处理后的 AOA 优势菌属为 OTU1(17.7%) , OTU2(23.3%) , OTU3(9.6%) , OTU4 (5.5%) , OTU5(7.1%) , OTU6(8.6%)共 6 种, 硫酸铵

和硝酸钙处理的 OTU 结构总体上相差不大。但是和 CK 相比, 氮肥的施用增加了优势菌属的种类。

**2.2.3 不同氮素处理后氨氧化细菌的 *amoA* 基因进化树分析** 用 3 种处理下香蕉土中 AOB 的 *amoA* 基因的主要 12 种 OTU 代表序列与基因库中最相近序列和 AOB 的标准菌株序列三者整合绘制出系统发生树如图 3。从系统发育树整体上可以看出本试

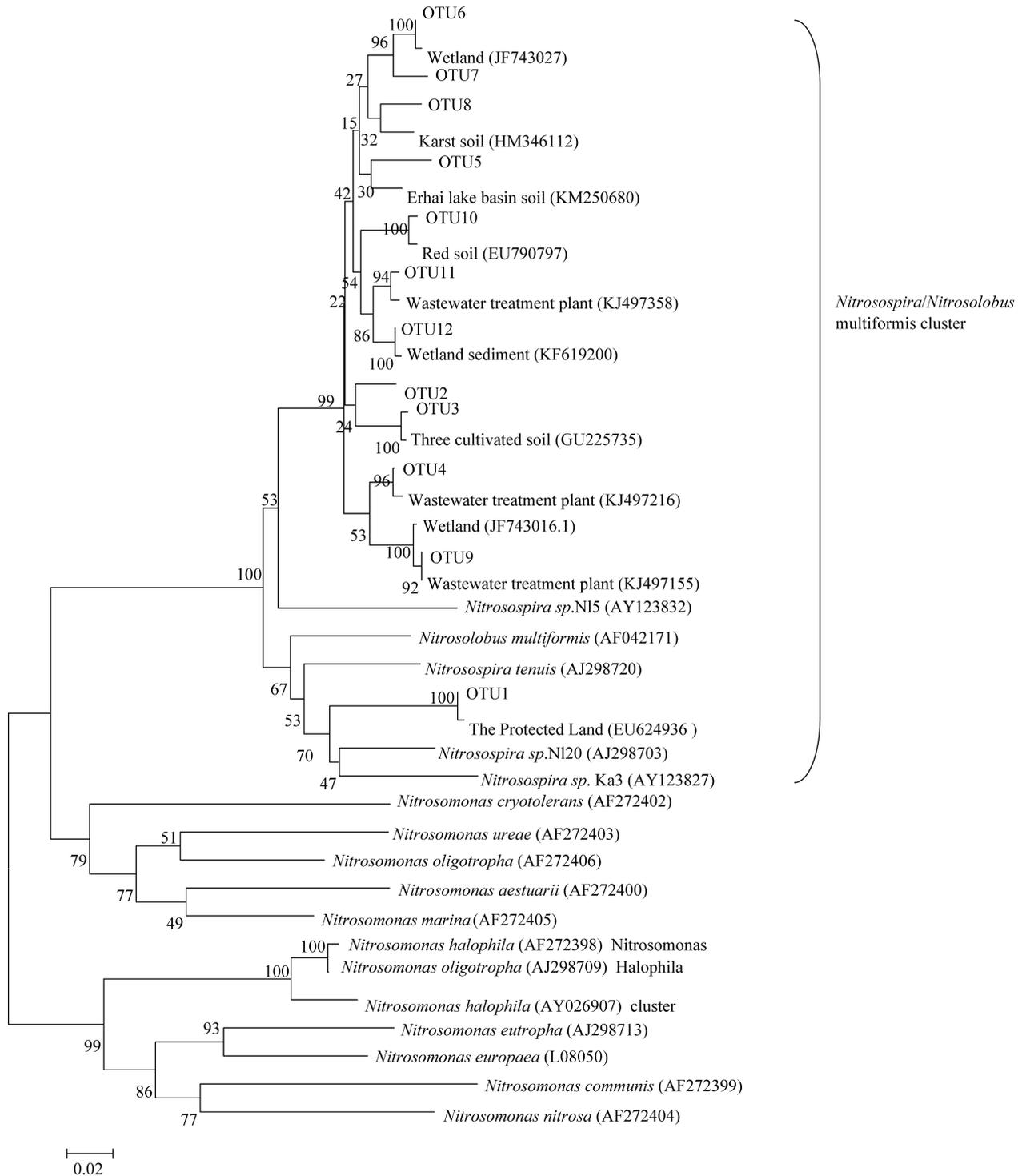


图 3 不同氮素处理下香蕉土氨氧化细菌的 *amoA* 基因的系统发育树(bootstrap value 值为 1 000)  
Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetics tree of AOB-*amoA* genes under different nitrogen treatments

验中的 AOB 的 *amoA* 基因克隆可能属于亚硝化螺菌属 *Nitrospira* 或多形亚硝化叶菌 *Nitrosolobus multiformis*, 另外从图上可以看出 OTU6、OTU7 和 OTU12 和来自湿地的未培养氨氧化古菌克隆系统发育分支中的距离接近, OTU1、OTU2、OTU3、OTU5、OTU8 和 OTU10 同来自土壤的未培养的氨氧化古菌克隆相似性相近, OTU4、OTU9 和 OTU11 和来自污水处理的植物的克隆相似性高。

**2.2.4 不同氮素处理后氨氧化古菌的 *amoA* 基因进化树分析** 用 3 种处理下的氨氧化古菌 *amoA* 基因主要包含 10 种 OTU 代表序列, 与基因库中最相近序列和 AOA 的标准菌株序列三者整合绘制出系统发生树如图 4。结果显示 OTU1、OTU7 和 OTU9 和来自湿地的氨氧化古菌克隆系统发育分支中的距离接近, OTU2 和 OTU5 同来自保护性农田的氨氧化古菌克隆

相似性高, OTU3、OTU4、OTU6、OTU8 和 OTU10 与来自土壤环境的克隆相似性高。

### 2.3 施肥对植物生长的影响

从图 5 可以看出: 施用硫酸铵和硝酸钙均显著提高了香蕉植株的生物量, 包括地上部和地下部干重, 其中施用硝酸钙的香蕉地上部和地下部干重最大。施用硝酸钙也显著提高了香蕉地上部和地下部的全氮含量, 并且高于施用硫酸铵的处理(图 5b)。因此, 施用硝态氮肥对香蕉生长和营养的促进作用要优于施铵态氮肥, 这说明香蕉更倾向于吸收硝态氮营养, 虽然我们前期的研究也发现, 单纯的铵或硝营养在水培香蕉的情况下也并不适合香蕉的生长, 铵硝混合营养才更利于香蕉的生长。本试验中施用硝酸钙的效果优于硫酸铵的原因是在香蕉种植的土壤中本来就有铵态氮, 施用硝态氮后就形成了一定的铵硝配比, 更适合香蕉的生长。

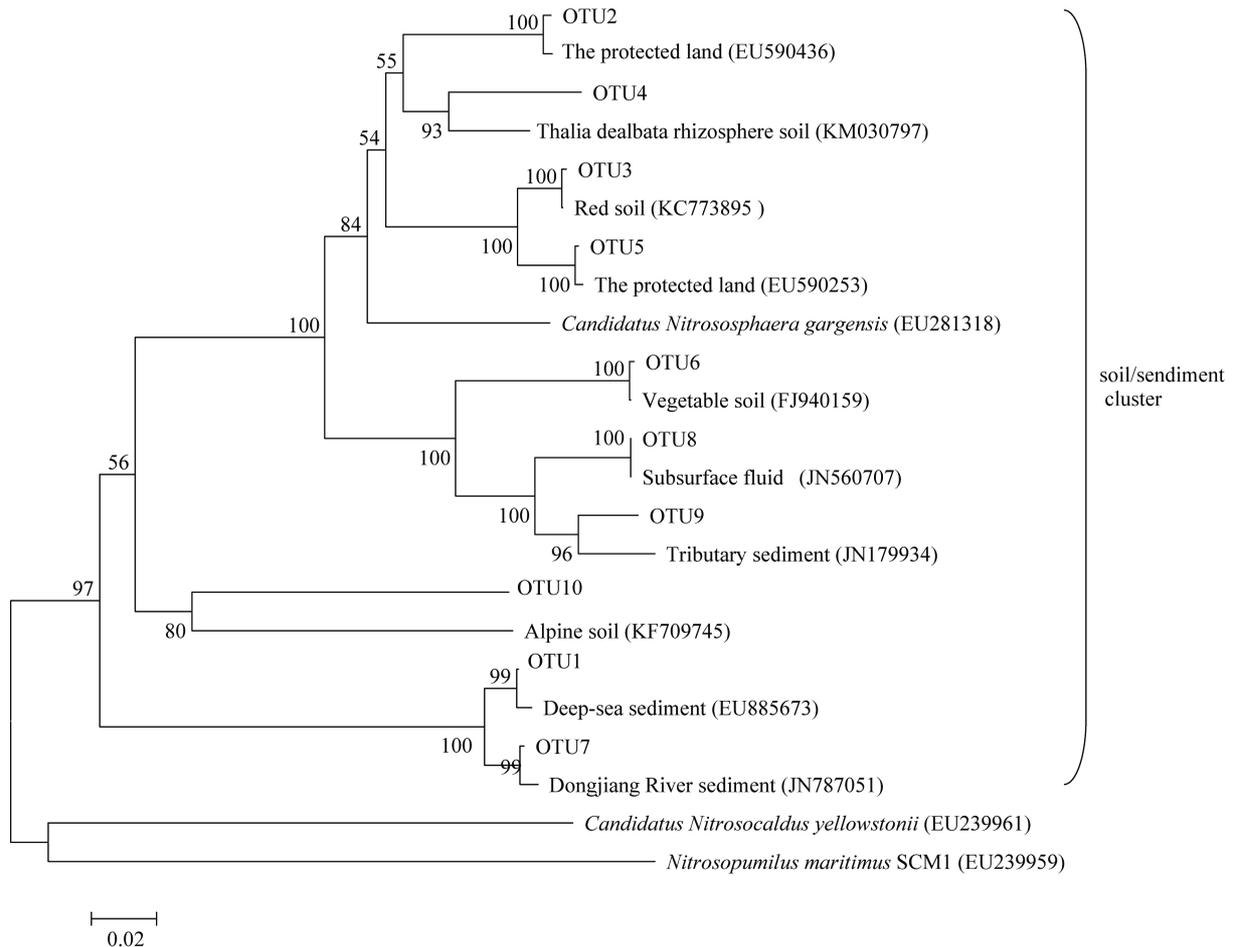


图 4 不同氮素处理下香蕉土氨氧化古菌的 *amoA* 基因的系统发育树(bootstrap value 值为 1 000)

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetics tree of AOA-*amoA* genes under different nitrogen treatments

### 3 讨论

土壤中的氨氧化过程是硝化作用的限速步骤, 此过程需要氨氧化细菌或古菌的氨单加氧酶 AMO

的催化, 其编码基因 *amoA* 具有高度的保守性以及专一的针对性, 因此通过对 *amoA* 基因序列和拷贝数的分析, 可以指示土壤中 AOB 和 AOA 的种类和数量<sup>[18]</sup>。早期研究表明所有土壤中氨氧化细菌都属

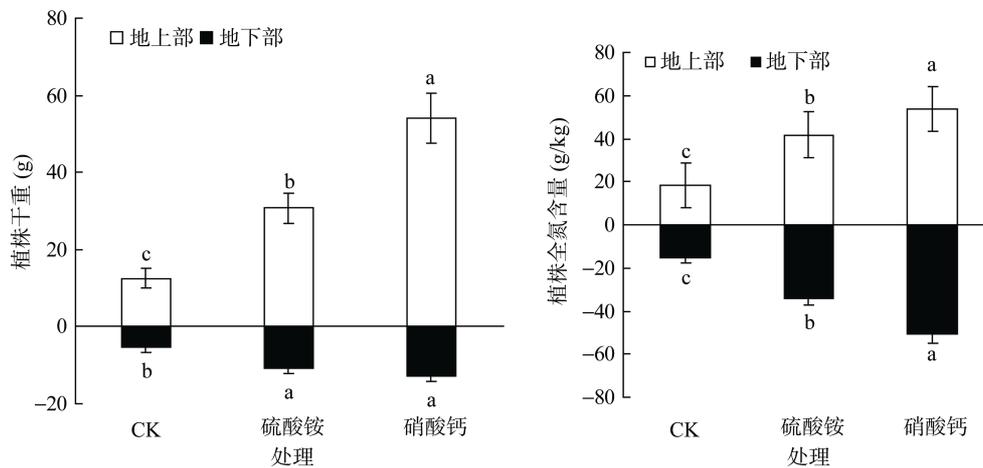


图 5 不同氮素形态对香蕉生物量和氮含量的影响

Fig. 5 Effects of different nitrogen forms on the biomass and the nitrogen contents of banana plants

于 *β-proteobacteria* 变形菌纲 *Nitrosospira* 亚硝化螺菌属和 *Nitrosomonas* 亚硝化单胞菌属<sup>[19]</sup>, 后来在酸性土壤和农田土壤发现 AOB 和亚硝化螺菌属更亲近<sup>[20-21]</sup>。从本研究发育树分析来看虽然大多数 AOB 与未培养氨氧化细菌克隆相近, 但是也有一部分 AOB 与亚硝化螺菌属亲缘关系较近, 本试验中得到的氨氧化古菌 *amoA* 基因序列与已知的来自土壤、废水和沉积物环境中获得序列相似性很高。这之前研究发现来自湿地的 AOA 的 *amoA* 基因有两个进化来源: 土壤与沉积物和沉积物与水相吻合<sup>[22]</sup>。我们试验还得出不同氮素处理的香蕉土 AOA 的 *amoA* 序列大多数与未培养的氨氧化古菌和古菌相似性高, 但是也有部分和未培养的泉古菌相似, 另外有极少部分和未培养的氨氧化奇古菌相似。

自然界中影响氨氧化微生物多样性的因素很多, 主要包含温度、土壤类型、pH 和铵浓度<sup>[23]</sup>。而且不同氨氧化微生物的群落对环境因素的响应程度存在较大差异。本试验研究结果表明硫酸铵会提高 AOB 的丰富度和多样性并且硫酸铵处理下 AOB 的 *amoA* 拷贝数明显高于 CK、硝酸钙处理。这之前研究 AOB 在铵态氮环境下, 群落组成更为丰富<sup>[24]</sup>, 随铵浓度的增加 AOB 的 *amoA* 拷贝数提高相一致<sup>[25]</sup>, 然而本试验中施硫酸铵处理会降低 AOA 的 *amoA* 基因拷贝数。可能存在两方面原因, 一方面由于高浓度的铵会抑制嗜热的泉古菌氧化铵的能力<sup>[26]</sup>。另一方面当同样铵浓度环境下, AOA 的生化反应动力学系数 KS 值比 AOB 的低, 所以细菌耐铵, 然而 AOA 不能抵抗强铵浓度<sup>[27-28]</sup>。从香蕉土 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因总体数量上来看, AOA 比 AOB 多一个数量级, 这与 Wuchter 等<sup>[29]</sup>报道的古菌 *amoA* 基因的拷贝数是  $\beta$ -变形菌纲细菌的 10~1 000 倍相符合。除此之外,

基于 *amoA* 基因的 AOB 和 AOA 的文库中, 我们发现 AOB 的多样性和丰富度指数都比 AOA 的高, 这与莫旭华等<sup>[30]</sup>的研究结果也符合。

#### 4 结论

铵态氮肥施用后虽然提高了香蕉种植土壤中 AOB 的丰富度和多样性, 并且 AOB 的 *amoA* 拷贝数也明显高于硝态氮处理。然而铵态氮肥会降低 AOA 的丰度, 在一定程度上抑制其种群大小, 这可能与海南香蕉种植过程中长期以来一直以铵态氮肥为主, 造成土壤酸性增强有关。从施肥效果来看, 如果土壤呈酸性反应, 铵态氮积累就多, 对植物生长也不利。因此通过增施硝态氮来改善氨氧化微生物区系, 并及时补充香蕉对硝态氮营养的需求, 在实践中是可行的, 在理论上还需要进一步研究与探索。

#### 参考文献:

- [1] Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, Schlesinger WH, Tilman DG. Human alteration of the global nitrogen cycle: Causes and consequences[J]. *Ecological Applications*, 7(3): 737-750
- [2] Veresoglou SD, Chen BD, Rillig MC. Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 46: 53-62
- [3] Forde BG, Clarkson DT. Nitrate and ammonium nutrition of plants: Physiological and molecular perspectives[J]. *Advances in Botanical Research*, 1999, 30: 1-90
- [4] Ravishankara AR, Daniel JS, Portmann RW. Nitrous oxide ( $N_2O$ ): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century[J]. *Science*, 2009, 326(5949): 123-125
- [5] De BW, Gunnewiek PJ, Veenhuis M, Bock E, Laanbroek HJ. Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria[J]. *APPI Environ. Microbiol.*, 1991, 57(12): 3 600-3 604

- [6] He JZ, Shen JP, Zhang LM, Zheng YM, Xu MG, Di H. 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[J]. *Environ. Microbiol.*, 2007, 9(12): 3 152
- [7] 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[J]. *Environ. Microbiol.*, 2008, 10(6): 1 601–1 611
- [8] Wertz S, Leigh AK, Grayston SJ. Effects of long-term fertilization of forest soils on potential nitrification and on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers[J]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2012, 79(1): 142–154
- [9] Long X, Chen CR, Xu ZH, Oren R, He JZ. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a temperate forest ecosystem under ten-years elevated CO<sub>2</sub>[J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2012, 46: 163–171
- [10] Xu YG, Yu WT, Ma Q, Zhou H. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidisers of an acidic luvisols soil to different nitrogen fertilization rates after 9 years[J]. *Biol. Fertil. Soils*, 2012, 48: 827–837
- [11] 傅真晶, 韦开蕾. 海南省香蕉生产的比较优势分析[J]. *热带农业科学*, 2010, 6(30): 6–10
- [12] 张俊华. 尿素用量及抑制剂施用对植蕉土壤 N<sub>2</sub>O、NO 排放和香蕉碳氮分配的影响[D]. 海口: 海南大学, 2012: 1–32
- [13] 霍敏霞, 邹杰, 黄芳英, 孟磊. 氮肥增效剂对海南砖红壤土壤氮转化影响的研究[J]. *中国土壤与肥料*, 2012(4): 34–38
- [14] 黄珍. 海南福山香蕉地土壤细菌和真菌多样性分析[D]. 海口: 海南大学, 2010: 1–48
- [15] Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4 704–4 712
- [16] 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[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102: 14 683–14 688
- [17] Gabor EM, Vries EJD, Janssen DB. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 44(2): 153–163
- [18] Rotthauwe JH, Boer WD, Liesack W. Comparative analysis of gene sequences encoding ammonia monooxygenase of *Nitrosospora* sp. AHB1 and *Nitrosolobus-Multiformis* C-71[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 133: 131–135
- [19] Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops HP, Wagner M. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5 368–5 382
- [20] Stephen JR, Kowalchuk GA, Bruns MAV, Mccaig AE, Phililps CJ, Embley TM, Prosser JI. Analysis of  $\beta$ -subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(8): 2 958–2 965
- [21] Avrahami S, Conrad R. Patterns of community change among ammonia oxidizers in meadow soils upon long-term incubation at different temperatures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 6 152–6 164
- [22] Wang S, Wang Y, Feng X, Zhai L, Zhu G. Quantitative analyses of ammonia-oxidizing Archaea and bacteria in the sediments of four nitrogen-rich wetlands in China[J]. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 90: 779–787
- [23] 黄蓉, 张金波, 钟文辉, 贾仲君, 蔡祖聪. 土地利用方式对万木林土壤氨氧化微生物丰度的影响[J]. *土壤*, 2012, 44(4): 581–587
- [24] Di HJ, Cameron KC, Shen JP, Winefield CS, O'Callaghan M, Bowatte S, He JZ. Nitrification driven by bacteria and not Archaea in nitrogen-rich grassland soils[J]. *Nature Geoscience*, 2009, 2: 621–624
- [25] Oved T, Shaviv A, Goldrath T, Mandelbaum RT, Minz D. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(8): 3 426–3 433
- [26] Hatzenpichler R, Lebedeva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(6): 2 134–2 139
- [27] Habbenha WM, Berube PM, Urakawa H, Torre JR, Stahl DA. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria[J]. *Nature*, 2009, 461: 976–979
- [28] Taylor AE, Bottomley PJ. Nitrite production by *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospora* sp. AV in soils at different solution concentrations of ammonium[J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2006, 38(4): 828–836
- [29] Wuchter C, Abbas B, Coolen MJL, Herfort L, Van Bleijswijk J, Timmers P, Strous M, Teira E, Herndl GJ, Middelburg JJ, Schouten S, Sinninghe Damsté JS. Archaeal nitrification in the ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(33): 12 317–12 322
- [30] 莫旭华, 史荣久, 李慧, 郑佳, 王元芬, 徐慧. 华北典型旱地小麦土壤 *amoA* 基因的 PCR-RFLP 分析[J]. *生态科学*, 2009, 28(1): 49–55

## Responses of Soil Bacterial and Archaeal Ammonia Oxidisers to Nitrogen Forms Applied to Banana Plants of Hainan

WEI Tian-jiao<sup>1</sup>, WEI Zhi-jun<sup>1</sup>, CHEN Peng<sup>1</sup>, RUAN Yun-ze<sup>2</sup>, ZHU Yi-yong<sup>1\*</sup>

(1 College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2 College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract:** Ammonia oxidizing microorganisms in the soil affects the conversion of nitrogen and indirectly affect crop nutrient absorption and nitrogen utilization. Therefore, this study investigated the banana plant growth and the community composition and abundance of ammonia oxidisers in soils after application of different nitrogen form fertilizers. The banana plants were cultivated in pots with soil collected from Ledong coast.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  were applied as N fertilizers. Plant growth and nutrient contents were determined. Soil ammonia oxidizing *amoA* gene clone library was constructed and analyzed. The results indicated that the copy number of the AOB *amoA* gene under  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  treatment was significantly higher than the control and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  treatment, the copy number of AOA *amoA* was the lower than the control and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  treatment. But the absolute number of ammonia-oxidizing archaea AOA in general were much higher than the number on the AOB. Community diversity and richness of AOB *amoA* also increased significantly under  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  treatment. However, the administration of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  did not change significantly. The community structure of AOA was similar between the  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  treatments, but the richness and diversity were higher than the control without fertilization. From fertilization effect, compared with ammonium sulfate, calcium nitrate significantly increased biomass and nitrogen content of banana plants. These results indicated that, in the south acidic soils with AOA predominate, the application of ammonium nitrogen fertilizer can promote AOB abundance and diversity, but is likely to inhibit the number of AOA. Therefore, in the littoral soil after application of ammonium nitrogen fertilizer, through nitrification can't meet the needs of banana absorbing nitrate, and nitrate fertilizer should be applied directly to promote the growth of bananas.

**Key words:** Banana; Ammonia-oxidizing bacteria; Ammonia-oxidizing archaea; Ammonium sulfate; Calcium nitrate