

文章编号: 1674-8085 (2021) 04-0053-06

铝胁迫对酸性红壤古菌 *amoA* 基因多样性的影响分析

尹 丽^{1,2}, 刘仁绿^{1,2}, 廖永辉^{1,2}, 宋勇生^{1,2}, *贺根和^{1,2,10}

(1.井冈山大学生命科学学院, 江西, 吉安 343009; 2.江西省红壤丘陵区农业环境污染防控重点实验室, 江西, 吉安 343009)

摘 要: 通过 PCR-RFLP 技术构建红壤丘陵区土壤氨氧化古菌 *amoA* 基因文库, 比较分析典型森林土和农田土中氨氧化古菌群落结构对铝胁迫的响应。通过对 628 个 *amoA* 基因克隆子进行了 PCR-RFLP 指纹图谱分析, 共获得 62 个独特的基因操作分类单元 (operational taxonomical units, OTUs), 进一步对 62 个 OTUs 开展 Blast 和 RDP 分类分析 (相似性 97%-100%), 结果表明: 森林和农田土壤样品中 100% 的氨氧化古菌属于泉古菌门 (*Crenarchaeotes*), 分布于 4 个基因簇 (Cluster1-4), Cluster 1 在所有测试样品中占明显优势。农田土壤中氨氧化古菌的丰度和多样性要高于森林土壤, 但随着铝胁迫浓度的增加, 农田土壤中氨氧化古菌丰度和多样性降低更明显, 均匀度却有所上升。可见, 铝胁迫导致土壤氨氧化古菌群落结构改变, 高铝胁迫能促使氨氧化古菌发生适应性变化, 有可能演变出优势种群。

关键词: 红壤丘陵; 铝胁迫; 氨氧化古菌; 种群结构; PCR-RFLP

中图分类号: Q939.124

文献标识码: A

DOI: 10.3669/j.issn.1674-8085.2021.04.011

EFFECTS OF ALUMINUM STRESS ON *amoA* GENETIC DIVERSITY OF ARCHAEA IN ACIDIC RED SOILS

YIN Li^{1,2}, LIU Ren-lu^{1,2}, LIAO Yong-hui^{1,2}, SONG Yong-sheng^{1,2}, *HE Gen-he^{1,2}

(1.School of Life Sciences, Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343009, China;

2. Key Laboratory of Agricultural Environmental Pollution Prevention and Control in Red Soil Hilly Region of Jiangxi Province, Ji'an, Jiangxi 343009, China)

Abstract: In this study, the genes library was constructed by using the PCR-RFLP technology and the community characteristics of ammonia-oxidizing archaea between the forest soils and the agriculture soils under different Al-treated concentrations were comparatively analyzed. A total of 628 of *amoA* genes cloned from 6 soil samples were analyzed. And 62 unique restricted fragment length polymorphism fingerprints were identified and sequenced. DNA sequence was analyzed by Blast and RDP classification (similarity 97 to 100%). The results showed that all of the ammonia-oxidizing archaea group in soil samples belonged to *Crenarchaeotes* and distributed in 4 gene clusters (Cluster 1-4). Among them, cluster 1 was dominant in all test samples. The abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea in agriculture soils were higher than that in forest soils. However, with the increase of aluminum stress concentration, the abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea in agriculture soils decreased significantly, but the evenness increased. It indicated that aluminum stress can change the community structure of soil ammonia-oxidizing archaea, and high aluminum stress can promote the adaptive change of oxygen ammonia-oxidizing archaea, which may evolve into a dominant population.

Key words: red soil hilly region; aluminum stress; ammonia-oxidizing archaea; community diversity; PCR-RFLP

收稿日期: 2021-03-06; 修改日期: 2021-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(41867032); 江西省科技厅自然科学基金项目(2020ACBL203011); 江西省教育厅科技计划项目(GJJ180554); 吉安市科技局重点项目(2019[55]); 井冈山大学服务地方项目 (JFD1902)

作者简介: 尹 丽(1983-),女,江西吉安人,讲师,硕士,主要从事环境科学与工程的教学与科研 (E-mail:youli-voyage@126.com);

刘仁绿(1989-),男,江西吉安人,讲师,博士,主要从事环境科学与工程的教学与科研 (E-mail:113786772@qq.com);

廖永辉(1985-),男,江西吉安人,副教授,博士,主要从事环境科学与工程的教学与科研 (E-mail:yshsongool@126.com);

宋勇生(1977-),男,江西吉安人,副教授,博士,主要从事环境科学与工程的教学与科研 (E-mail:494886672@qq.com);

*贺根和(1977-),男,江西永丰人,教授,博士,主要从事环境生物学的研究(E-mail: hegenhe@jgsu.edu.cn).

在微酸性和中性土壤中,铝主要以三价氧化态和稳定的矿物质形式存在,随着土壤 pH 的降低,铝以离子态释放到土壤溶液中,对土壤生物产生较强的毒害作用^[1-2]。红壤分布于我国南方地区,铝含量较高。酸性沉降导致 pH 下降和活性含量升高, pH 下降会导致土壤质量下降已是不争的事实^[2]。然而,酸性沉降导致的土壤质量的下降是 pH 改变直接导致的结果,还是由于铝对作物或者微生物的毒性导致的结果呢?以酸性红壤作为研究对象,研究铝对植物生长影响已有大量的报道^[3]。铝对红壤微生物影响的研究报道较少。我们前期研究表明,当土壤中活性铝含量增加时,土壤细菌和真菌的数量、活性及种群结构均会发生改变^[2,4],说明铝胁迫可以通过改变土壤微生物的行为而影响土壤质量。

氨氧化是全球氮循环的关键过程,主要通过硝化作用完成。硝化作用是微生物将氨转换成硝酸盐的过程,其中氨氮氧化成亚硝酸盐是硝化作用的限制性步骤,起直接作用的酶是氨单加氧酶(ammonium monooxygenase, AMO)^[6]。近年来,国内外学者利用 amoA 基因作为标记,从分子水平上研究环境样品中氨氧化菌的种群特征和系统发育状况^[5]。近年来,越来越多的研究结果发现泉古菌(Crenarchaeota)具有很强的氨氧化能力,这群独特的微生物迅速吸引了人们的目光,成为一个新的研究热点^[7-8]。

红壤区是我国主要的粮食产区,壤中的碳、氮和磷等是影响土壤肥力和植物生长发育的重要营养元素^[9]。然而,土壤酸化导致活性铝含量的升高对古菌种群影响的研究报道较少。本实验以红壤地区典型的农田土壤和森林土壤为研究材料,应用古细菌 amoA 基因克隆文库技术分析不同铝浓度胁迫下红壤氨氧化古菌群落结构组成情况。通过研究酸性土壤中氨氧化古菌的多样性,对开发利用红壤中丰富的微生物资源以及理解酸性沉降对氨氧化古菌的多样性的影响提供参考依据,并为进一步研究我国酸性土壤地区微生物生态系统提供重要参考。

1 材料和方法

1.1 样品收集

以红壤丘陵区森林土壤(Forest soils, FOR)和农田土壤(Agriculture soils, AGR)为研究对象,森

林土壤样品取自江西省井冈山海拔 83 m 处的常绿阔叶林(27°06'N, 115°01'E),试验区属于温和的亚热带季风气候,雨水充沛,四季分明;农田土壤从距森林边缘不超过 200 m 的农田中采集。土样采用五点法收集 0-20 cm 的土层。样品取好后用封口袋封装带回实验室,一部分土样贮藏在 4℃ 的冰箱中备用;一部分风干、磨碎后通过 2 mm 筛后,供土壤理化特性分析,土壤的基本理化特性见表 1。

表 1 土壤基本理化特征

Table 1 The basic physicochemical properties of studied soils

Parameter ^a	FOR soil	AGR soil
pH	4.56	6.12
OM/(g·kg ⁻¹)	17.8	81.2
AN/(mg·kg ⁻¹)	125.2	1053
AP/(mg·kg ⁻¹)	4.25	57.6
AK/(mg·kg ⁻¹)	48.6	178.6
Fe ₂ O ₃ /(mg·kg ⁻¹)	22.8	11.9
Monomeric Al/(mg·kg ⁻¹)	12.4	1.86
EC/(dS·m ⁻¹)	0.25	5.52

^aOM: organic matter; AN: available N; AP: available P; AK: available K; EC: Electrical conductivity.

1.2 实验设计

将 100 g 土壤样品置于 250 mL 的锥形瓶中,调节土壤含水量为田间持水量的 60%,将土壤置于 28℃ 的人工气候箱中预培养 1 周。1 周后将铝(AlCl₃·6H₂O)加入土壤,添加 Al³⁺的浓度分别为 0、100、200 mg·kg⁻¹(干土),铝加入后充分混合,置于 28℃ 的人工气候箱中温育,保持如上的土壤水分含量。被测土壤分别标记为 F₀(森林土,加 ddH₂O),F₁₀₀(森林土,100 mg·kg⁻¹ Al³⁺),F₂₀₀(森林土,200 mg·kg⁻¹ Al³⁺)和 A₀(农田土,加 ddH₂O),A₁₀₀(农田土,100 mg·kg⁻¹ Al³⁺),A₂₀₀(农田土,200 mg·kg⁻¹ Al³⁺)。所有的实验均设 3 个重复,分别培养后在第 30 d 从锥形瓶中取样进行分析。

1.3 菌株、培养基与试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α、pMD18-T Vector、氨苄青霉素和 DNA 回收试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;PCR 引物由上海生工合成。

1.4 DNA 提取

DNA 提取按 Ezup 柱式土壤 DNA 抽提试剂盒的方法进行,试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.5 古细菌 amoA 基因 PCR 扩增

采用氨氧化细菌特异性用于扩增古细菌 *amoA* 基因。引物为 Arch-*amoA*F: 5'-STAATGGICTGGCTTAGACG-3', Arch-*amoA*R: 5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3'。扩增反应体系为: 10×buffer 缓冲液 5 μL, dNTP (25 mmol/L) 2 μL, 引物 21F (10 pmol/μL) 1 μL, 引物 958R (10 pmol/μL) 1 μL, 模板 (基因组 DNA) 4 μL, Taq DNA 聚合酶 (5U/μL) 0.5 μL, 双蒸水 36.5 μL, 总体积 50 μL。扩增条件: 94℃预变性 5min; 94℃变性 30 s, 53℃复性 45 s, 72℃延伸 45 s, 最后 72℃延伸 10 min。

5 μL PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)电泳检测。PCR 产物纯化: 用 UNIQ-10 柱式 DNA 纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化, 纯化产物和 PMD18-T 质粒载体进行重组而后导入到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。

1.6 古细菌 *amoA* 基因文库的构建

纯化后古细菌 *amoA* 扩增产物分别与 pMD18-T 载体进行连接, 条件为: pMD18-T 0.5 μL, 超纯水 1.5 μL, PCR 纯化产物 3 μL, Ligation Mix 5 μL, 16℃连接 1.5 h, 然后 4℃过夜。连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 随机选择大约 150 个阳性菌落进行菌体 PCR 证实 *amoA* 序列插入完成。PCR 引物为 M13F (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') and M13R (5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3')。接着 6 个来自不同处理的土壤样品 *amoA* 基因克隆文库创建完成 (F₀、F₁₀₀、F₂₀₀、A₀、A₁₀₀ 和 A₂₀₀), 相应的克隆依次从 1 到 628 标记。

1.7 古细菌 *amoA* 基因的 RFLP(限制性片段多态性)分析

通过引物 M13F/R PCR 筛选阳性克隆的产物分别用 *Hha* I 和 *Rsa* I 两个限制酶消化 (37℃, 1 h)。

酶切 DNA 片段用 2% 的琼脂糖凝胶 (H, 上海生工) 电泳分离, 经 SYBR Green I 染色和凝胶成像系统成像后, 所得 DNA 带型图谱在 GIS 凝胶分析软件辅助下进行人工比较。以基因片段多态图谱为基础进行聚类, 聚合到一起的具有相同图谱的克隆需要用第 2 种限制性内切酶进行消化与电泳分离。当第二次所获得的基因图谱仍然相同时, 则认为它们是相同的基因型。每一个基因型作为一个分类操作单位 (OTU, Operational Taxonomic Unit) 或称为唯一基因型^[10]。选取每个 OUT 中的代表克隆送上海生工测序。将序列上的载体序列去除并去除嵌合序列后, 通过 NCBI 序列分析工具 Blast (www.ncbi.nlm.gov/blast/blast.cgi) 和 RDP 聚类分析分类 (RDP classifier, <http://rdp.cme.msu.edu/>), 确定序列的种属特征。

1.8 数据统计分析

用文库总的克隆和 OTU 数量计算文库的库容 (C)^[11]:

$$C = [1 - (n1/N)] * 100\% \quad (1)$$

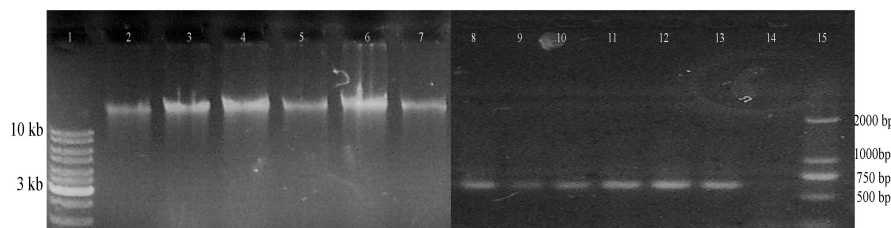
其中, 代表在文库中仅出现一次的 OTU 的数量, N 为文库中总克隆数。

应用 Mothur 聚类分析分析文库内种群的多样性指数 (距阵小于或等于 0.02)^[12]。通过 clustal X 2.0^[13] and Mega 5.0^[14] 构建基于 *amoA* 基因序列的系统发育树。

2 结果

2.1 土壤 DNA 的提取和古菌 *amoA* 基因的扩增

从 6 个土壤样品中提取 DNA 并用巢式 PCR 扩增古菌 *amoA* rDNAs。提取的 DNA 和 PCR 扩增产物在 1% (w/v) 琼脂糖电泳并通过凝胶成像系统拍照, 所得产物片段大小与预期的大小一致 (图 1)。



Lane 1 indicates 10 kb DNA ladder (Sangon); Lanes 2, 3, 4, 5, 6, 7 indicate soil DNA extracted from F₀, F₁, F₂, A₀, A₁ and A₂, respectively; Lanes 8, 9, 10, 11, 12, 13 indicate PCR products amplified from template DNA F₀, F₁, F₂, A₀, A₁, A₂, respectively; Line 14 indicates PCR products amplified from control sample (ddH₂O); Lane 15 indicates DL2000 DNA ladder (Takara)

图1 土壤样品DNA(左)和 *amoA* 基因PCR产物(右)

Fig.1 Soil DNA (Left) and PCR amplification of archaeon *amoA* gene fragments (Right)

2.2 古菌 amoA 基因克隆文库的构建和 PCR-RFLP 分析

从 6 份 DNA 样品的克隆文库中随机挑选 628 个白斑进行阳性检测，确定了 602 个阳性克隆，阳性克隆率达到 95.9%。将 602 个 *amoA* 基因克隆子 PCR 鉴定产物用限制性内切酶 *Rsa* I 和 *Hal* I 酶切并进行多态性分析，65 个独特的 OTU 被确定。从 65 个 OTUs 中随机挑取 1 个克隆子进行测序，序列去除含嵌合子后，确定了 62 个独立的 *amoA* 基因序列。Blast 和 RDP 系统发育分析结果表明，62 个 *amoA* 基因序列 100% (62) 属于 *Crenarchaeotes* (泉古菌门)，相似性为 97-100%，分布于 4 个基因族 (Cluster1-4)(图 2)。其中，Cluster 1 占 38.7%(24)，Cluster 2 占 25.8% (16)，Cluster 3 占 14.5% (9)，

Cluster 4 占 21.0% (13)。Cluster 1 氨氧化古菌在所有测试样品占比最多，其相对丰度在 FOR 土壤分别达 39.5%，40.0%和 44.7%，在 AGR 土壤分别达 38.2%，42.9%和 38.5%。Cluster 3 含量最低，在两种供试土壤中随着铝浓度变的差异性明显，在高铝浓度农田土中检测不到 Cluster 3 的存在（表 2）。

表 2 古菌 amoA 基因的相对丰度 (%)

Table 2 Relative abundances of archaeon amoA gene (%)							
archaeon amoA gene groups	Total	F ₀	F ₁₀₀	F ₂₀₀	A ₀	A ₁₀₀	A ₂₀₀
Cluster 1	38.7	39.5	40.0	44.7	38.2	42.9	38.5
Cluster 2	25.8	23.7	10.0	0	29.4	43.7	34.6
Cluster 3	14.5	7.9	10.0	12.5	11.8	0	0
Cluster 4	21.0	28.9	40.0	45.8	20.6	25.0	26.9

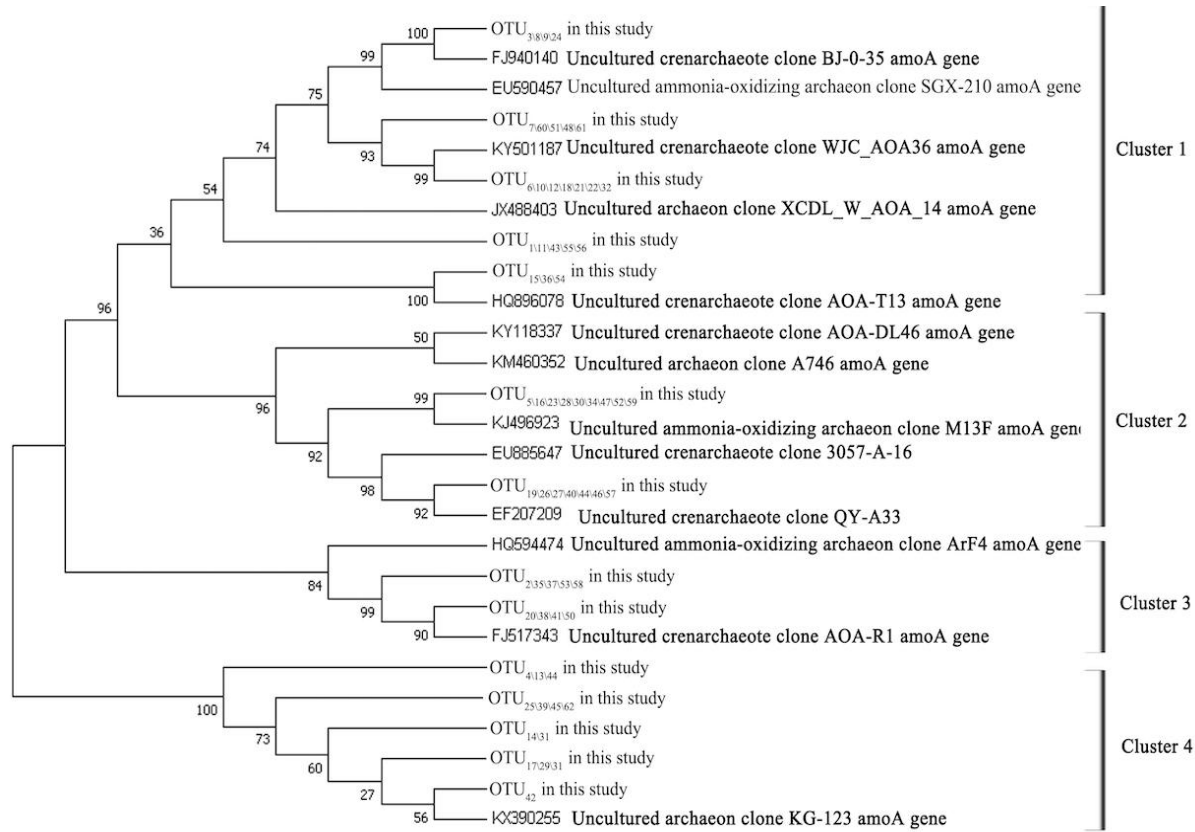


图2 依据amoA功能基因序列构建的氨氧化古菌的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees of ammonia-oxidizing archaea targeted on *amoA* gene

2.3 酸性土壤中铝胁迫对氨氧化古菌种群多样性的影响

所构建的 6 个基因文库库容(C)从 64.8%到 81.1%(表 3)，文库库容值较大，覆盖程度较高，代表性较好，这表明文库能比较真实代表不同铝处理

浓度下土壤样品中氨氧化古菌的多样性。从表 3 可以看出氨氧化古菌的多样性明显受铝胁迫的影响。Shannon 和 Simpson 指数值表明，铝浓度的提高会降低土壤氨氧化古菌多样性，却能在一定程度上提高其均匀度，而且铝胁迫对农田土壤的影响要高于

森林土壤。A₀ 土壤样品氨氧化古菌种群多样性最高，均匀度最低，相对更多的种群被发现于 A₀ 中。

表 3 古菌 amo 基因克隆文库的多样性指数

Table 3 Archaeon diversity index in amoA gene clone libraries from tested soils

Soil samples	OTU richness number	Total clones	Coverage (%)	Chao1 index	ACE richness index	Simpson index	Shannon index
F ₀	34	112	70.0	120.9	178.8	0.005	3.43
F ₁₀₀	30	98	69.4	83.5	145.6	0.012	3.24
F ₂₀₀	20	95	78.9	70.6	99.5	0.014	3.13
A ₀	38	108	64.8	125.8	163.9	0.009	3.66
A ₁₀₀	28	99	71.7	146.6	140.8	0.010	3.24
A ₂₀₀	17	90	81.1	99.5	126.4	0.012	3.05

3 讨论

氨氧化古菌广泛地分布于海洋和陆地土壤，对生态系统中氮素循环过程中发挥着重要作用。土壤酸化严重影响土壤质量，也影响着土壤氮素转化微生物的分布及特征^[7-9]。同时，长期的环境胁迫会导致土壤微生物的多样性及功能发生了一些适应性改变^[15]。我们前期的研究表明随着酸性红壤 Al³⁺浓度的增大，土壤环境中真菌生长及数量会受到抑制，但也会产生一些耐受性强的优势种群^[2]。目前，已有不少文献报道土壤氨氧化古菌的群落结构及相对丰度与土壤理化性质存在一定的相关性^[6,16-17]。然而，酸性红壤中铝胁迫对氨氧化古菌种群结构变化的研究报道则较少。

分子生物学技术被认为是对土壤微生物种群丰度解析最有效的方法^[18]。PCR-RFLP 扩增氨氧化古菌 amoA 基因序列作为一种便捷的技术被广泛用于土壤氨氧化菌多态性的分析^[19]。本研究表明，酸性红壤中分布的氨氧化古菌 100%（62）属于 *Crenarchaeotes*（嗜泉古菌界），这与目前多数研究的报道相一致。进一步通过 Blast 分析发现酸性红壤中的氨氧化古菌分布于 4 个基因族（Cluster1-4）（图 2），而且在两种供试土壤中随着铝浓度的变化差异性明显，在高铝浓度农田土中检测不到 Cluster 3 的存在（表 3），说明农田土中存在的基因族 Cluster 3 氨氧化古菌对铝的敏感性更强，抑或该族菌在农田土中多样性较低，相关的原因还需要进一步的深入研究。

酸性化肥的施用会导致稻田土壤酸化，在一定程度上会促进氨氧化古菌优势种群的生长，进化出对 NH₃ 具有较高亲和力的新种群，并能在酸性土壤中发挥主导作用^[20]。本实验通过比较两种典型酸性土壤样品中氨氧化古菌多样性的差异，发现农田土壤和森林土壤所含的氨氧化古菌种群有所不同，农田土壤中氨氧化古菌具有较高种群丰度和多样性，在 A₀ 土壤样品的种群多样性最高，结果与上述研究结果具有明显一致性。我们进一步研究表明，随着铝胁迫浓度的增加，两种土壤中氨氧化古菌的丰度明显下降，农田土中氨氧化古菌对铝的胁迫表现得更为敏感，而且不同基因族（Cluster1-4）在不同土壤中表现出较大的差异（表 3）。可见，农田土壤可能由于酸性肥料的施加，一定程度降低了土壤氨氧化古菌的多样性，同时还能在一定程度提高了其分布的均匀度和丰富度，其结果可能与种群的特异性有关，这能为高浓度铝胁迫下高耐性氨氧化古菌的分离鉴定提供了重要的理论依据。

4 小结

随着全球酸沉降的日益严重以及酸性肥料在农业中的大量使用，红壤丘陵区土壤富铝化作用加剧。铝毒可以通过影响土壤微生物的作用进而影响土壤生态功能，促进红壤提质增效势在必行。我们的研究表明，铝胁迫导致土壤氨氧化古菌群落结构改变，高铝胁迫下厌氧氨氧化菌也会发生适应性的转变；农田土壤由于酸性肥料的施用，氨氧化古菌群落分布受铝胁迫的影响大于森林土壤。

参考文献：

- [1] Paul I, Ulrike O, Franz S. Microbiological properties in acidic forest soils with special consideration of KCl extractable Al[J]. Water, Air, and Soil pollution, 2003, 148: 3-14.
- [2] 贺根和,王小东,刘强,吴吉春. 铝胁迫对酸性红壤中真菌种群多样性的影响[J]. 农业环境科学学报. 2014, 33(9): 1736-1742.
- [3] Yan L, Riaz M, Liu J, Yu M, Jiang C. The aluminum tolerance and detoxification mechanisms in plants; recent advances and prospects[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2021, DOI:

- 10.1080/10643389.2020.1859306.
- [4] 贺根和. 铝胁迫对红壤微生物的生态毒理效应及微生物的耐铝特性研究[D]. 南京: 南京大学, 2012.
- [5] Wang F, Liang X, Ma S, Liu L, Wang J. Ammonia-oxidizing archaea are dominant over comammox in soil nitrification under long-term nitrogen fertilization[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2021, 21:1800-1814.
- [6] Starke R, Siles J A, Fernandes M L P, et al. The structure and function of soil archaea across biomes[J]. *Journal of Proteomics*, 2021, 237:104147.
- [7] Nicola GW, Schleper C. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? [J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(5): 207-212
- [8] Wei, H C Lin X B. Shifts in the relative abundance and potential rates of sediment ammonia-oxidizing archaea and bacteria along environmental gradients of an urban river-estuary-adjacent sea continuum[J]. *Science of The Total Environment*, 2021, 771:144824
- [9] 王欣丽, 朱飞, 姚静, 等. 长期施肥对酸性土壤氨氧化微生物群落的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24(2): 375-382.
- [10] 夏北成, Zhou J, Tiedje 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.
- [11] Giovannoni S J, Mullins T D, Field K G. Microbial diversity in oceanic systems: rRNA approaches to the study of unculturable microbes[J]. *Nato Asi Series Geocological Sciences*, 1995, 38: 217-217.
- [12] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mother: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75:7537-7541.
- [13] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23: 2947-2948.
- [14] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10):2731-9.
- [15] Martin M S, Santos I C, Carlton J D, et al. Characterization of bacterial diversity in contaminated groundwater using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *The Science of the total environment*, 2018, 622-623:1562-1571.
- [16] 张静, 杨鹏, 余伟, 等. 攀枝花不同海拔高度烤烟农田红壤中氨氧化细菌与氨氧化古菌的群落结构分析[J]. *生态学报*, 2021, 41(8):1-8.
- [17] 刘晶静, 吴伟祥, 丁颖, 等. 氨氧化古菌及其在氮循环中的重要作用[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(8):2154-2160.
- [18] He J Z, Zheng Y, Chen C R, et al. Microbial composition and diversity of an upland red soil under long-term fertilization treatments as revealed by culture-dependent and culture-independent approaches[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2008, 8:349-358.
- [19] Viaud M, Pasquier A, Brygoo Y. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS[J]. *Mycological Research*, 2000, 104 (9):1027-1032.
- [20] Verhamme D T, Prosser J I, Nicol G W. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(6): 1067-1071.