

长期施肥对土壤氨氧化微生物的影响

刘灵芝 马诗涵 李秀玲 安婷婷* 汪景宽

(沈阳农业大学土地与环境学院, 土壤资源高效利用国家工程实验室/农业部东北耕地保育重点实验室, 沈阳 110866)

摘要 长期施肥可改变土壤碳氮等养分供应,进而影响微生物数量与群落组成。本研究基于棕壤长期定位实验站,分析不同施肥方式下(不施肥,CK;低量无机氮肥, N_2 ;高量无机氮肥, N_4 ;有机无机氮肥配施, M_2N_2)土壤氨氧化古菌(AOA)和细菌(AOB)的变化,为土壤氮素转化的微生物学机制和培肥土壤提供依据。结果表明:不同施肥方式下,土壤 AOA 与 AOB 的数量比值为 2.28~61.95。与 CK 相比,施肥后土壤 AOA 数量降低了 1.6%~13.6%。 N_4 处理 AOB 数量随土壤深度增加呈先降低后升高的趋势,其他处理则相反。土壤 AOB 群落 Shannon 多样性指数、均匀度指数和 Simpson 指数均高于 AOA。 M_2N_2 处理 0~20 cm 土层土壤 AOB 多样性增加,但 AOA 多样性降低。土壤 AOB 主要因土壤深度发生聚类,AOB 和 AOA 均未因施肥方式发生聚类。综上,长期施肥改变了土壤 AOA 和 AOB 的构成状况,AOA 对环境变化较为敏感,AOB 较为丰富和稳定。

关键词 氨氧化古菌;氨氧化细菌;长期施肥;多样性

Effects of long-term fertilization on soil ammonia-oxidizing microorganisms. LIU Ling-zhi, MA Shi-han, LI Xiu-ling, AN Ting-ting*, WANG Jing-kuan (*National Engineering Laboratory for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources/Ministry of Agriculture Key Laboratory of Arable Land Conservation in Northeast China, College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China*).

Abstract: Long-term fertilization can change the supply of soil carbon and nitrogen (N), with consequences on the abundance and community structure of soil microorganisms. Based on the long-term fertilization positioning experiment station of brown earth, we analyzed the dynamics of soil ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) under different fertilization treatments, including no fertilization (CK), low level of inorganic N fertilizer (N_2), high level of inorganic N fertilizer (N_4), and organic manure combined with inorganic N fertilizer (M_2N_2), aiming to provide a basis for microbiological mechanism of soil N transformation and improvement of soil fertility. The results showed that the ratio of AOA to AOB abundance was 2.28–61.95 under different fertilization treatments. Compared with that in CK, the AOA abundance was reduced by 1.6%–13.6% after long-term fertilization. The abundance of AOB in N_4 treatment decreased first and then increased with soil depths, but with contrary results in other treatments. The Shannon diversity index (H), evenness index (J), and Simpson index (S) of AOB were higher than those of AOA. The AOB diversity was increased at 0–20 cm soil layer in M_2N_2 treatment, while that of AOA was decreased. Soil AOB clustered with soil depths, and neither AOA nor AOB community clustered with fertilization treatments. In summary, long-term fertilization altered the composition of AOA and AOB. AOA was sensitive to environment, whereas AOB was more abundant and stable.

Key words: ammonia-oxidizing archaea; ammonia-oxidizing bacteria; long-term fertilization; diversity.

本文由辽宁省高等学校基本科研项目(LSNZD201705)、辽宁省自然科学基金项目(2019-MS-271)和国家自然科学基金项目(31101504)资助
This work was supported by the Basic Scientific Research Project of Universities in Liaoning Province (LSNZD201705), the Natural Science Foundation of Liaoning Province (2019-MS-271), and the National Natural Science Foundation of China (31101504).

2019-10-26 Received, 2020-03-05 Accepted.

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: atting@syau.edu.cn

土壤肥力是农业生产的基础,施肥作为提高土壤肥力、维持农业可持续发展的重要农业措施之一,在保障作物增产稳产的同时,也带来了土壤退化、生物多样性下降和环境污染等诸多问题。各种施肥措施中,土壤有机肥具有养分均衡、释放缓慢持久等特点,其与无机氮肥配施,既可提高并稳定土壤肥力,亦可达到高产稳产的目的^[1-2]。

土壤微生物驱动的铵态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)氧化为硝态氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)过程称为硝化过程。该过程连接土壤固氮作用和反硝化作用,并与施用氮肥导致的土壤质量下降、环境污染等问题密切相关,在土壤生态系统的氮素平衡中发挥着重要作用,是土壤氮循环的中心环节^[3]。土壤氨氧化作用作为硝化过程的限速步骤,也是土壤氮素循环的关键环节。该过程受多种氨氧化微生物共同驱动。其中,氨氧化细菌(AOB)和古菌(AOA)的数量、种群结构特征和多样性指数已成为判断土壤肥力和健康状况的生物指标之一。长期不同施肥方式改变了土壤碳氮等养分供应,进而可能影响土壤中氨氧化微生物(AOM)的数量和种群多样性。其中,长期施用无机氮肥可导致土壤酸化和土壤养分不均衡,抑制土壤中AOM的数量^[4-5]。Wang等^[6]发现,长期无机氮肥的输入明显提高了小麦/玉米轮作条件下土壤硝化强度和氨氧化微生物(AOA和AOB)的数量。美国Illinois西北地区35年施用高量氮肥虽然显著增加了连作玉米根区土壤AOB丰度,却明显抑制了AOA^[1]。Su等^[7]发现,长期单施无机氮肥显著增加了双季稻田土壤AOA丰度,降低了AOB丰度,但AOA和AOB多样性都升高。与单施无机氮肥相比,长期有机无机氮肥配施可通过改变土壤细菌的结构组成及其功能多样性,影响土壤养分周转过程,进而提高作物产量^[2]。赵普生等^[8]研究水旱轮作体系下的中性紫色土发现,与AOA相比,长期施加氮肥对土壤中AOB丰度的影响较大,其中,有机无机氮肥配施能支持更大的土壤氨氧化微生物群体,从而增加土壤中氨氧化潜势和硝化强度。这与裴雪霞等^[5]的研究结果相似。综上,长期施肥特别是单施无机氮肥或有机无机氮肥配施对土壤AOA和AOB数量、群落结构和种群多样性的影响并不一致,且主要集中在表层土壤氨氧化微生物的研究。长期施肥不仅影响表层土壤养分的有效性,而且使土壤剖面养分分配产生分异^[9-11],而关于不同施肥方式下土壤剖面氨氧化微生物的丰度和群落结构特征还不很清楚。因此,明确土壤氨氧化微生物数量、群落结构和种群

多样性对施肥方式的响应,对进一步认识农田土壤氮素转化机制具有重要意义。

东北黑土区是保障我国粮食安全的“压舱石”,而长期高强度利用加之土壤侵蚀,导致黑土有机质含量下降,理化性状与生态功能退化,进而制约该区域农业可持续发展。施肥是土壤肥力提升和作物增产的重要措施。本研究在沈阳农业大学近30年棕壤长期定位实验站,选取不施肥(CK)、低量无机氮肥(N_2)、高量无机氮肥(N_4)、有机无机氮肥配施(M_2N_2)4种不同施肥处理,结合实时荧光定量PCR(qPCR)方法和PCR-DGGE技术,分析土壤剖面AOA和AOB的丰度、种群特征及其驱动因素,以期探索土壤功能微生物对长期施肥的响应,为本地区农田土壤氮素肥力提升及肥料的合理施用提供依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

供试土壤样品采自棕壤长期定位试验站。该试验站建立于1987年,位于辽宁省沈阳市沈阳农业大学,地理位置为 $41^\circ 49' \text{ N}$, $123^\circ 34' \text{ E}$,属大陆季风气候区,土壤类型为黄土状母质发育的棕壤,连作玉米(*Zea mays*)。本研究选取4个不同施肥处理,分别为:不施肥(CK);低量无机氮肥(N_2),氮肥施用量为 $135 \text{ kg N} \cdot \text{hm}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$;高量无机氮肥(N_4),施肥量为 N_2 处理的2倍;有机无机氮肥配施(M_2N_2),有机肥和无机氮肥施用量折合纯N量均为 $135 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$ 。施用的无机氮肥为尿素,有机肥为猪廐肥。所有肥料均作为基肥一次性施入。小区面积为 69 m^2 ,各处理均3次重复。

土壤样品采集于2015年4月20日(施肥前),采用五点法分别采集各小区0~20、20~40和40~60 cm土层土壤。采集的土壤去除石砾、玉米根系等非土壤成分后,一部分样品置于 -80°C 冰箱保存,用于分析土壤硝化强度和DNA提取,剩余样品按照常规方法保存,用于土壤理化性质测定。土壤pH采用电位法(土:水=1:2.5)测定;土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 采用 CaCl_2 浸提,将提取液用连续流动分析仪(SEAL AA3HR,德国)测定;硝化强度具体测定过程参考赵爽等^[12]的方法。

1.2 分析方法

1.2.1 土壤微生物总DNA提取 采用E.Z.N.Z.TM Soil DNA Kit(OMEGA,美国)试剂盒提取,具体提取过程参考试剂盒说明书。提取的DNA分别采用Qubit和1%的琼脂糖凝胶检测质量后,分装保存于

-20 ℃ 冰箱用于后续分析。

1.2.2 AOA 和 AOB 功能基因 (*amoA* 基因) 的荧光定量 PCR 检测 用 SYBR Green 定量 PCR 法分别测定 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因丰度,使用 ABI 7500 StepOne Plus(美国)进行荧光定量 PCR 检测。反应体系 (20.0 μL) 包括: 10.0 μL GoTaq® qPCR Master Mix, 上游和下游引物各为 0.8 μL (10 μmol · L⁻¹), DNA 模板 2.0 μL (1~10 ng) 和无 DNA 水 6.4 μL。AOA-*amoA* 基因引物序列为: Arch-*amoA*F (5'-TAATGGTCTGGCTTAGACG-3') 和 Arch-*amoA*R (5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3'), 目的基因长度为 624 bp, 反应条件为: 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 45 个循环, 72 ℃ 5 min^[13]。AOB-*amoA* 基因引物序列为: *amoA*-1F (5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3') 和 *amoA*-2R (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3'), 目的基因长度为 466 bp, 反应条件为: 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 53 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 45 个循环, 72 ℃ 5 min^[13]。质粒的构建和标准曲线的制备方法参见文献[13]。AOB 和 AOA 的 *amoA* 基因标准曲线的 *R*² 值均达到 0.99, 扩增效率在 99%~108%。

1.2.3 PCR 扩增 AOB-16S rDNA 和 AOA-*amoA* 基因序列 利用巢式扩增方法扩增 AOB 的 16S rDNA 的 V3 区域, 反应体系 (25 μL) 包括: 1 μL DNA 模板, 上、下游引物 (20 μmol · L⁻¹) 各 0.5 μL, 12.5 μL 2×Taq 反应混合物和 10.5 μL 无 DNA 水。AOB16S rDNA 扩增依次使用的引物为 8F/1492R、CTO 189F/654R 和 GC-341F/519R (表 1), PCR 扩增产物长度约为 190 bp。AOA *amoA* 基因扩增引物为 GC-Arch-*amoA*F/Arch-*amoA*R, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分别检测后备用。

表 1 PCR-DGGE 的引物序列和反应程序^[13]
Table 1 Primers and PCR-DGGE thermal profiles^[13]

引物名称 Primer name		引物序列 Primer sequence (5'-3')	PCR 程序 Thermal profile for PCR
AOA	GC-Arch- <i>amoA</i> F*	CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGG- GGCGGGGGCGCGGGGGTAAT- GGTCTGGCTTAGACG	94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 53 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 30 个循环; 72 ℃ 终延伸 10 min
	Arch- <i>amoA</i> R	GCGGCCATCCATCTGTATGT	
AOB	8F	TCCGGTTGATCCTGCC	94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 变性 1 min, 58 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 90 s, 35 个循环; 72 ℃ 终延伸 10 min
	1492R	GGCTACCTTGTTACGACTT	
	CTO189F	GGAGGAAAGTAGGGGATCG	95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 10 个循环; 92 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 25 个循环; 72 ℃ 终延伸 10 min
	CTO654R	CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC	
	GC-341F*	CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGG- GCGGGGCACGGGGGCCTACGG- GAGGCAGCAG	95 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 变性 1 min, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 9 个循环; 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 每个循环降落 0.5 ℃, 72 ℃ 延伸 2 min, 9 个循环; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 9 个循环; 72 ℃ 终延伸 8 min
	519R	GTATTACCGCGGCTGCTG	

1.2.4 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析 移取 15 μL PCR 产物进行上样分析, AOA 和 AOB 分别采用浓度为 6% 和 8% 的聚丙烯酰胺凝胶 (化学变性剂为 100% 尿素 7 mol · L⁻¹ 和 40% (V/V) 的去离子甲酰胺), 变性梯度分别为 20%~40% 和 35%~55%, 二者均在 1×TAE 缓冲液中电泳 (180 V、60 ℃) 6 h, 然后采用 Gene Finder 法染色, 利用 Gel-Doc XR 凝胶成像系统拍照, 采用 Quantity-One 软件进行 DGGE 图谱分析。

1.3 数据处理

由于不同处理间 AOA 和 AOB 的数量差异太大, 定量 PCR 得到的基因拷贝数均进行以 10 为底的对数转换。采用 SPSS 20.0 软件处理数据, 单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和邓肯法进行差异显著性检验, 利用 Pearson 法进行相关性分析 ($\alpha = 0.05$)。图表中数据为平均值±标准误。

微生物群落结构多样性指数计算公式如下:

$$H = - \sum_{i=1}^{S_0} (n_i/N) \ln(n_i/N)$$
$$J = H/\ln S_0$$
$$S = 1 - \sum_{i=1}^{S_0} P_i^2$$

式中: *H* 为 Shannon 多样性指数; *n_i* 为单一条带的强度; *N* 为所有条带的总强度; *J* 为均匀度指数; *S₀* 为每一泳道总的条带数; *S* 为 Simpson 指数; *P_i* 为某一个样品中 (即每个泳道) 属于第 *i* 种条带强度占总条带强度的比例, 即 *P_i* = *n_i* / *N*。

2 结果与分析

2.1 长期施肥处理下土壤基本性质的变化

施肥对土壤氮素含量、pH 值和硝化强度的影响

因土壤深度不同而异。随土壤深度增加,所有处理 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量均呈降低趋势(表 2)。与 CK 相比,施肥分别使相同土层 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量显著增加了 90.6% ~ 350.0% 和 96.6% ~ 1281.7%。在 20~60 cm 土层,各施肥处理间 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量无显著差异;与无机氮肥处理(N_2 和 N_4)相比, M_2N_2 处理显著增加了各土层 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量。随土壤深度增加,所有处理土壤 pH 均呈上升趋势。与 CK 相比,施肥大多降低了土壤 pH 值,降幅为 3.8% ~ 25.1%。与无机氮肥处理(N_2 和 N_4)相比, M_2N_2 处理提高了各土层 pH 值。与 CK 相比, M_2N_2 和 N_4 处理分别显著增加了表层(0~20 cm)和亚表层(20~40 cm)土壤的硝化强度。

2.2 长期施肥处理下土壤氨氧化微生物丰度特征

由图 1 可知,不同施肥处理土壤 AOA 数量为 $3.30\times 10^6\sim 3.51\times 10^7\text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$ (干土)。相同土壤深度下,与 CK 相比,所有施肥处理使土壤 AOA 数量显著降低了 1.6% ~ 13.6%,其中, M_2N_2 处理土壤 AOA 数量低于 N_2 和 N_4 处理。在不同土壤剖面深度,CK 和 N_4 处理在 0~20 cm 土层 AOA 数量最高, N_2 和 M_2N_2 处理在 20~40 cm 土层最高。

不同施肥处理土壤 AOB 数量为 $3.20\times 10^5\sim 4.61\times 10^6\text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$ (干土)。与 CK 相比,除 N_4 外,施肥显著降低了相同土层中 AOB 数量,降幅为 0.6% ~ 13.0%。 N_4 处理 AOB 数量在 0~20 和 40~60 cm 土层中较其他处理高 13.5% ~ 17.4%,而在 20~40 cm 土层却降低。不同土壤深度,除 N_4 外,CK、 N_2

和 M_2N_2 处理土壤 AOB 数量均在 20~40 cm 土层中达到最高。

土壤 AOA/AOB 数值在 2.28~61.95。与不施肥相比,施肥降低了各土层中二者的比值(20~40 cm 除外);与施无机氮肥(N_2 和 N_4)相比, M_2N_2 处理有助于稳定土壤中二者的比值。

2.3 长期施肥处理下土壤氨氧化微生物种群组成特征

由图 2 可以看出,条带 1、2、11 为 CK 所特有;条带 5 为 N_4 处理 0~40 cm 土层土壤所特有;条带 9、10、12、13 存在于所有处理土壤中。尽管不同施肥处理可导致土壤 AOA 种群结构的变化,但除 CK 20~60 cm 土层土壤与 N_2 处理 0~20 cm 土层土壤相似性为 66%,以及 N_4 处理 20~40 cm 与 40~60 cm 土层土壤相似性为 72%外,各处理并未表现出明显的施肥或土层聚类。

由图 3 可以看出,条带 3 为 CK、 N_2 和 N_4 处理土壤所特有;条带 6 只存在于 CK 和 M_2N_2 处理土壤中;多数条带存在于所有处理土壤中,说明土壤中多数 AOB 能够适应土壤环境变化。图谱中存在许多肉眼不能分辨的条带,暗示土壤中存在较为丰富的氨氧化细菌种类。

聚类分析表明,不同施肥处理土壤聚为 3 簇, N_2 和 M_2N_2 处理 20~40 cm 土层土壤与 N_4 处理 40~60 cm 土壤聚为一簇,相似性为 60%; N_2 和 M_2N_2 处理 0~20 cm 土层土壤和 N_4 处理 20~40 cm 土层土壤聚为一类,相似性为 50%;其他处理聚为一簇,其

表 2 不同施肥处理土壤基本特征
Table 2 Soil basic characteristics in different fertilization treatments

土层 Soil layer (cm)	施肥处理 Fertilization treatment	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	pH	硝化强度 Nitrification intensity
0~20	CK	1.27±0.07cA	5.60±0.23dA	5.85±0.07aA	7.80±0.40cB
	N_2	2.42±0.82bA	11.01±0.71cC	5.06±0.10cC	9.60±0.40bA
	N_4	3.91±0.68aA	16.46±0.35bA	4.38±0.03dC	5.70±0.10dB
	M_2N_2	2.91±0.52bA	24.08±0.16aA	5.46±0.13bBC	15.67±0.15aA
20~40	CK	0.52±0.01bB	4.77±0.10dB	5.99±0.13aA	10.47±0.35bA
	N_2	2.05±0.18aA	14.93±0.57bB	5.25±0.10cB	3.77±0.12dB
	N_4	2.08±0.14aB	12.76±0.70cB	5.55±0.31bcA	12.87±0.15aA
	M_2N_2	2.07±0.15aB	20.11±0.32aB	5.76±0.15abAB	5.10±0.10cB
40~60	CK	0.36±0.06bC	1.15±0.10dC	5.78±0.13aA	3.00±0.40bC
	N_2	1.62±0.07aA	12.43±0.71bA	5.44±0.22bA	1.73±0.21cC
	N_4	1.60±0.62aB	10.82±0.53cC	5.14±0.10bB	4.93±0.21aC
	M_2N_2	1.55±0.08aB	15.89±0.56aC	5.90±0.02aA	2.67±0.21bC

CK: 不施肥 No fertilization; N_2 : 低量无机氮肥 Low amount of inorganic nitrogen fertilizer; N_4 : 高量无机氮肥 High amount of inorganic nitrogen fertilizer; M_2N_2 : 有机无机氮肥配施 Organic manure combined with inorganic nitrogen fertilizer. 下同 The same below. 同列不同小写字母表示同一土层不同施肥处理间差异显著,同列不同大写字母表示同一施肥处理不同土层间差异显著 ($P<0.05$) Different lowercase letters in the same column showed significant difference among different fertilization treatments in the same soil layer, and different uppercase letters in the same column showed significant difference among different soil layers in the same fertilization treatment at 0.05 level.

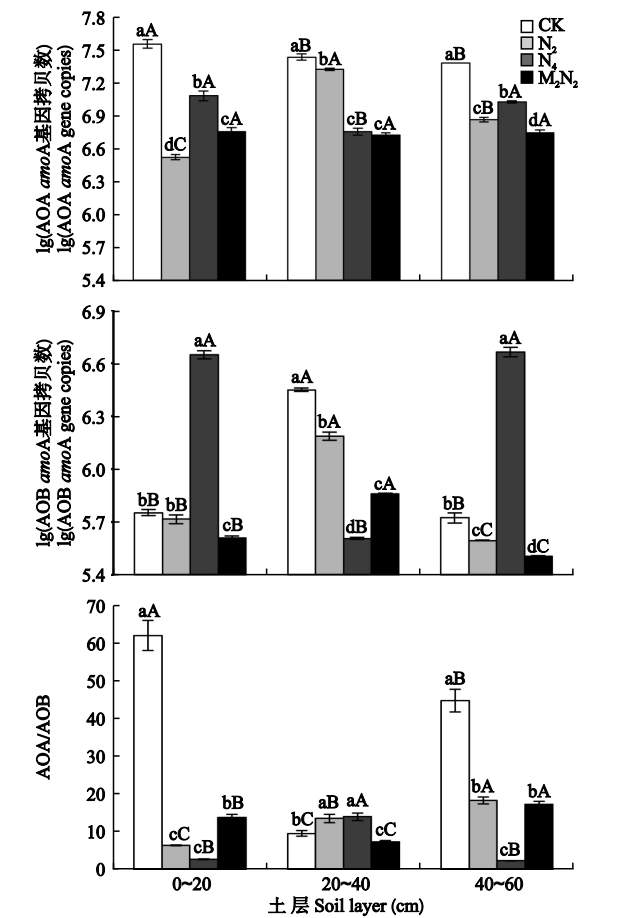


图1 不同施肥处理土壤 AOA 和 AOB 丰度
Fig.1 Abundances of soil AOA and AOB in different fertilization treatments.

CK: 不施肥 No fertilization; N₂: 低量无机氮肥 Low amount of inorganic nitrogen fertilizer; N₄: 高量无机氮肥 High amount of inorganic nitrogen fertilizer; M₂N₂: 有机无机氮肥配施 Organic manure combined with inorganic nitrogen fertilizer. 下同 The same below. 不同小写字母表示同一土层不同施肥处理间差异显著, 不同大写字母表示相同施肥处理不同土层间差异显著 (P<0.05) Different lowercase letters showed significant difference among different fertilization treatments in the same soil layer, and different uppercase letters showed significant difference among different soil layers in the same fertilization treatment at 0.05 level.

中 CK、N₂ 和 M₂N₂ 处理 40~60 cm 土层土壤相似性为 58%。土壤 AOB 16S rDNA 基因表现出较为明显的土层聚类行为。

2.4 长期施肥处理下土壤氨氧化微生物种群多样性特征

土壤 AOB 的 Shannon 多样性指数 (H) 随土壤深度增加而增加 (表 3)。在 0~20 cm 土层, 施肥处理土壤 AOB 的 H 值均高于 CK, 其中 M₂N₂ 处理最高。不同处理土壤 AOB 均匀度指数 (J) 为 0.970~0.990, 且处理间差异不显著。不同土层土壤 AOB 的 Simpson 指数 (S) 表现为 40~60 cm>20~40 cm>0~20 cm。在 0~20 cm 土层, 施肥处理土壤 AOB 的 S 值高于 CK, 而在 20~60 cm 土层, 则低于 CK。

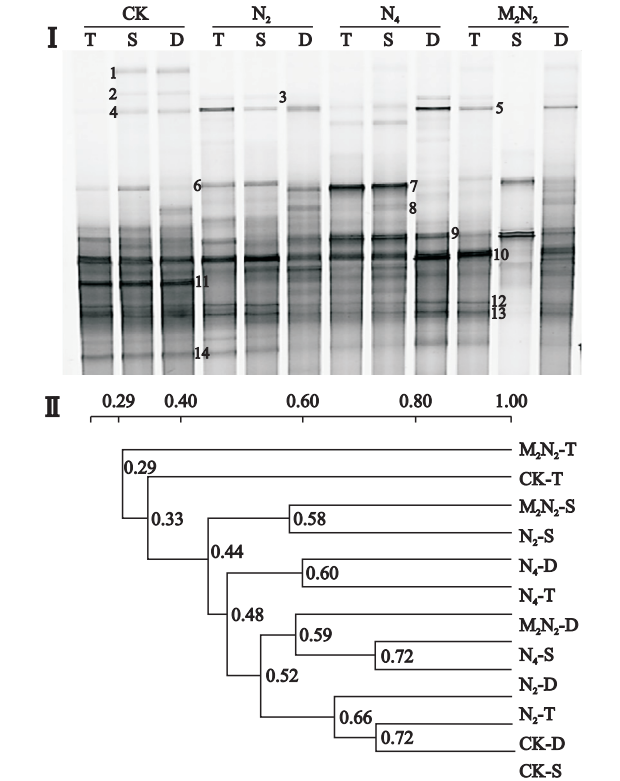


图2 不同施肥处理土壤 AOA amoA 基因 DGGE 图谱 (I) 和聚类结果 (II)
Fig.2 DGGE fingerprint (I) and clustering result (II) of soil AOA amoA gene in different fertilization treatments.
T: 0~20 cm; S: 20~40 cm; D: 40~60 cm. 下同 The same below.

与 CK 相比, 施加无机氮肥 (N₂ 和 N₄) 处理显著增加了 0~20 cm 土层土壤 AOA 的 H 值, M₂N₂ 处理则显著降低了 H 值; 在 20~60 cm 土层, 施肥处理 (除 N₂ 处理 40~60 cm 外) 均显著降低了土壤 AOA 的 H 值。土壤 AOA 的 J 值在 40~60 cm 最高, 0~20 cm 和 20~40 cm 之间无显著差异; 在 0~20 cm 土层中, 施肥处理土壤 J 值低于 CK, 其中 M₂N₂ 处理最低。土壤 AOA 的 S 值变化特征与 H 值相似。

2.5 土壤理化因子与氨氧化微生物种群特征的相关性

长期施肥土壤氨氧化微生物多样性指数、丰度 (lg amoA 基因拷贝数) 与土壤理化因子 (硝化强度、pH、NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N) 之间的相关性分析表明, AOB 丰度与土壤中 NH₄⁺-N (r=-0.473) 和 NO₃⁻-N 含量 (r=-0.638) 呈显著负相关; AOB 种群多样性指数 (H、J 和 S) 与土壤理化因子均无显著相关性 (表 4)。

AOA 丰度与土壤 pH 呈显著负相关 (r=-0.478)。AOA 种群 Shannon 多样性指数 (r=-0.600) 和 Simpson 指数 (r=-0.559) 与土壤 NO₃-N 含量均呈显著负相关, 均匀度指数则与土壤硝化强度呈显著负相关 (r=-0.511)。这说明土壤中

表 3 基于 DGGE 指纹图谱的 AOM 种群多样性指数
Table 3 Diversity indices of ammonia-oxidizing microbial community based on DGGE fingerprint

土层 Soil layer (cm)	处理 Treatment	AOB			AOA		
		<i>H</i>	<i>J</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	<i>J</i>	<i>S</i>
0~20	CK	2.889	0.981	0.941	2.342	0.977	0.900
	N ₂	2.972	0.976	0.945	2.502	0.975	0.914
	N ₄	3.145	0.990	0.955	2.477	0.966	0.910
	M ₂ N ₂	3.191	0.979	0.955	1.955	0.940	0.844
20~40	CK	3.151	0.979	0.954	2.613	0.965	0.922
	N ₂	3.047	0.986	0.950	2.399	0.965	0.904
	N ₄	3.168	0.984	0.956	2.410	0.970	0.905
	M ₂ N ₂	3.028	0.980	0.948	1.328	0.958	0.722
40~60	CK	3.306	0.982	0.961	2.602	0.961	0.921
	N ₂	3.208	0.985	0.957	2.617	0.992	0.925
	N ₄	2.953	0.970	0.942	2.203	0.957	0.883
	M ₂ N ₂	3.104	0.977	0.951	2.536	0.989	0.919

H: Shannon 多样性指数 Shannon diversity index; *J*: 均匀度指数 Evenness index; *S*: Simpson 指数 Simpson index.

NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 含量和 pH 是影响氨氧化微生物分布的重要因素;硝化强度与土壤 AOA 均匀度指数呈负相关。因此,在长期施肥土壤中 (pH 5.0~6.0),与 AOB 相比,AOA 对土壤氮素等的变化更敏感。

3 讨 论

3.1 长期施肥对土壤氨氧化微生物数量的影响
土壤硝化作用是由微生物参与的生物学过程。

施肥可提高土壤养分含量,促进微生物生长。其中,有机无机肥配施不仅可以满足微生物生长的能量来源,而且使土壤养分的分布和累积更为丰富、均匀和持久^[14]。研究发现,长期施用氮肥显著增加了土壤中氨氧化菌的丰度^[15-17],但也有研究表明,长期施用氮肥导致土壤酸化、土壤养分不均衡,进而显著降低了红壤^[5]、黄棕壤^[6]、东北黑土^[18]和草甸草地土壤^[19]中 AOA 和 AOB 的数量。另外,有研究发现,施肥对土壤中 AOA 数量无明显影响^[20-21]。本研究中,长期施肥 (N₄ 处理除外) 与不施肥相比,土壤 AOA 和 AOB 丰度均显著降低,且 M₂N₂ 处理 AOA 数量低于无机氮肥处理 (N₂ 和 N₄)。这进一步证实了在农田生态系统中,施肥对土壤氨氧化菌丰度的影响非常复杂,肥料种类、施肥方式和土壤类型等因素都会导致氨氧化微生物响应的差异^[14,22]。

表 4 土壤理化因子与氨氧化微生物多样性指数的相关性系数

Table 4 Correlation coefficients between soil physicochemical properties and ammonia-oxidizing microbial diversity indices in soil

微生物 Microbe	多样性指数 Diversity index	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	pH	硝化强度 Nitrifying capacity
AOB	<i>H</i>	-0.099	-0.032	-0.086	0.001
	<i>J</i>	0.325	-0.087	-0.288	-0.122
	<i>S</i>	-0.041	-0.017	-0.043	0.006
	lg <i>amoA</i>	-0.473 **	-0.638 **	0.216	-0.196
AOA	<i>H</i>	-0.256	-0.600 **	-0.089	-0.173
	<i>J</i>	-0.199	-0.29	0.124	-0.511 **
	<i>S</i>	-0.207	-0.559 **	-0.129	-0.109
	lg <i>amoA</i>	0.145	-0.116	-0.478 **	-0.109

lg *amoA* 为 *amoA* 基因拷贝数对数 The lg number of *amoA* gene copies.
** *P*<0.01.

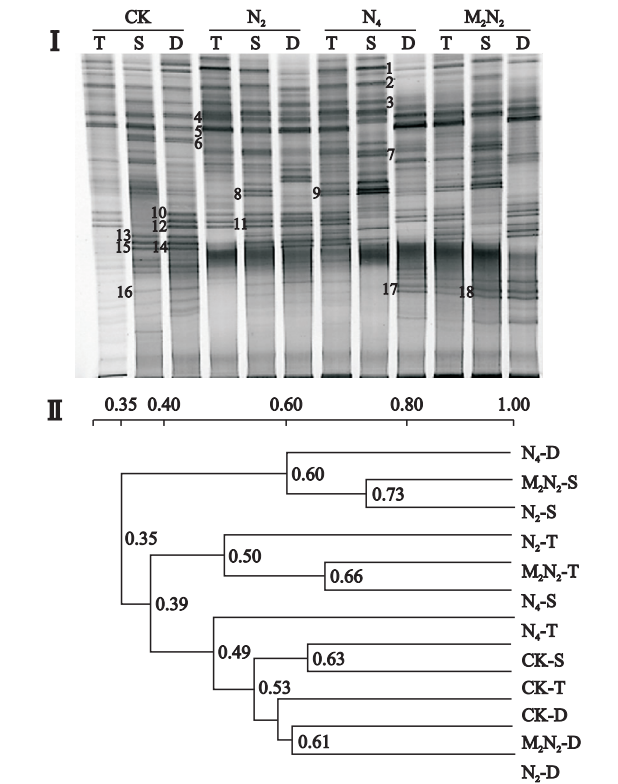


图 3 不同施肥处理土壤 AOB 16S rDNA 基因 DGGE 图谱 (I) 和聚类结果 (II)

Fig.3 DGGE fingerprint (I) and clustering result (II) of soil AOB 16S rDNA gene in different fertilization treatments.

pH 是限制土壤 AOA 和 AOB 生长的重要因素之一。由于酸性土壤中硝化底物 NH_3 质量分数降低, AOA 在氨氧化过程中发挥重要作用^[14,23]。本研究中, 与不施肥相比, 长期施肥虽显著提高了不同土层中 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量, 但不同程度地降低了土壤 pH 值。相较于 N_2 和 N_4 处理, M_2N_2 处理显著提高了土壤 pH 值。土壤 AOA/AOB 在 2.28~61.95, 说明无论施肥与否, 土壤硝化过程应主要受 AOA 驱动。土壤 AOA/AOB 在 20~40 cm 土层出现拐点, 这可能与长期不同施肥处理养分在土壤剖面的迁移累积有关^[9-11,13]。长期不施肥处理导致土壤养分贫乏, AOA 能适应寡营养环境, 使不施肥处理不同土层土壤 AOA 的丰度显著高于其他施肥处理。单施无机氮肥 (N_4 和 N_2 处理) 与 M_2N_2 处理相比 AOA 丰度相对较高, 这可能与长期施用无机氮肥导致土壤 pH 值降低有关。相关分析也表明, AOA 丰度与土壤 pH 呈显著负相关, 这与许多研究结果相一致^[7-8,24], 即 pH 是影响土壤 AOA 的主要驱动因子, 陆地生态系统土壤 AOA 的数量均较 AOB 丰富。长期高量无机氮肥的施用对不同土层 (20~40 cm 除外) 土壤 AOB 有促进作用, 且 AOB 的丰度与 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量呈显著负相关。

3.2 长期施肥对土壤氨氧化微生物种群多样性的影响

长期施用氮肥导致土壤中 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度发生明显变化, 刺激或抑制不同氨氧化微生物类群的生长^[22], 显著改变土壤 AOA 和 AOB 丰度, 进而影响氨氧化微生物的结构组成及其多样性^[14,16]。本研究中, 土壤 AOA 和 AOB 种群分布均未因施肥处理表现出聚类, 但 AOB 种群结构在不同土层表现出一定的聚类行为。结合种群多样性指数分析可以看出, 不同施肥处理对土壤 AOB 和 AOA 的丰度和多样性指数的垂直分布影响各异。土壤 AOB 种群多样性指数较高, 表现出更为丰富、稳定的分布。长期施肥虽然降低了土壤 AOB 数量, 但 AOB 在氮素需求得到满足后, 可通过增加其种群多样性来适应土壤环境变化。土壤 AOB 种群垂直分布受各土层土壤温度、通气状况和养分供应等因素影响, 进而表现出土层聚类的结果^[15,25]。与 AOB 不同, 土壤 AOA 更耐受较低的 pH 值, 其种群多样性较低, 且对环境变化较为敏感。AOA 可能通过调整不同种群的丰度来适应环境变化, 并维持其种群结构的相对稳定。

长期施肥导致土壤 AOB 种群多样性增加, 然而 AOB 种群数量和多样性指数与土壤硝化强度均无

显著相关性。长期施肥虽降低了土壤 AOA 种群多样性, 但 AOA 的均匀度指数与土壤硝化强度呈显著负相关, 表明土壤中特定的 AOA 类群可能在硝化作用中发挥重要作用。有研究指出, 在氮素较为丰富的农田土壤中, 虽然 AOA 在数量上占优势, 但 AOB 却表现出更高的氨氧化活性^[26]。本研究未检测 AOB 和 AOA 基因表达的差异, 因此, 二者在长期施肥土壤中参与硝化作用的贡献还有待进一步研究。

长期施肥条件下土壤 AOB 的硝化活性受无机氮肥的影响更大^[15], AOB 多在 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度较高时发挥氨氧化作用。施用有机肥使土壤有机氮浓度升高, 有助于利用有机氮的 AOA^[21]。本研究发现, 与无机氮肥处理 (N_2 和 N_4) 相比, M_2N_2 处理增加了 0~20 cm 土层土壤 AOB 的多样性指数 (J 指数除外), 降低了 AOA 的多样性指数。其原因可能与本研究采样时土壤温度较低, 有机氮的周转和微生物活性受到抑制有关。同时, 受长期施肥和土壤类型等因素的影响, AOA 生长所需的碳、氮等养分发生改变, 种群多样性发生变化。

参考文献

- [1] Huang L, Riggins CW, Rodríguez-Zas S, et al. Long-term N fertilization imbalances potential N acquisition and transformations by soil microbes. *Science of the Total Environment*, 2019, **691**: 562-571
- [2] Ding LJ, Su JQ, Sun GX, et al. Increased microbial functional diversity under long-term organic and integrated fertilization in a paddy soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, **102**: 1969-1982
- [3] 杨亚东, 宋润科, 赵杰, 等. 长期不同施肥制度对水稻土氨氧化微生物数量和群落结构的影响. *应用生态学报*, 2018, **29** (11): 3829-3837 [Yang Y-D, Song R-K, Zhao J, et al. Effects of long-term different fertilization regimes on the abundance and community structure of ammonia oxidizers in paddy soils. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, **29** (11): 3829-3837]
- [4] He JZ, Shen JP, Zhang LM, et al. 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. *Environmental Microbiology*, 2007, **9**: 2364-2374
- [5] 裴雪霞, 周卫, 梁国庆, 等. 长期施肥对黄棕壤性水稻土氨氧化细菌多样性的影响. *植物营养与肥料学报*, 2011, **17** (3): 724-730 [Pei X-X, Zhou W, Liang G-Q, et al. Effects of long-term fertilization on ammonium oxidizing bacterial diversity in a paddy soil derived from yellow-brown earth. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2011, **17** (3): 724-730]
- [6] Wang F, Chen S, Wang Y, et al. Long-term nitrogen fertilization elevates the activity and abundance of nitrifying and denitrifying microbial communities in an upland soil: Implications for nitrogen loss from intensive agricultural systems. *Frontiers in Microbiology*, 2018,

- 9: 2424, DOI: 10.3389/fmicb.2018.02424
- [7] Su JQ, Ding LJ, Xue K, *et al.* Long-term balanced fertilization increases the soil microbial functional diversity in a phosphorus-limited paddy soil. *Molecular Ecology*, 2015, **24**: 136–150
- [8] 赵普生, 韩苗, 熊子怡, 等. 长期定位施肥对中性紫色土硝化作用及氨氧化微生物的影响. 中国土壤与肥料, 2018(5): 85–90 [Zhao P-S, Han M, Xiong Z-Y, *et al.* Effects of long-term fertilization on the nitrification and ammoxidation in neutral purple soil. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2018(5): 85–90]
- [9] 史文娇, 汪景宽, 祝凤春, 等. 施肥与覆膜对棕壤 Olsen-P剖面分布及动态变化的影响. 植物营养与肥料学报, 2007, **13**(2): 248–253 [Shi W-J, Wang J-K, Zhu F-C, *et al.* Effects of fertilization and mulching with plastic film on profile distribution and dynamics of Olsen-P in brown earth. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2007, **13**(2): 248–253]
- [10] 刘顺国, 汪景宽. 长期地膜覆盖对棕壤剖面中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 动态变化的影响. 土壤通报, 2006, **37**(3): 443–446 [Liu S-G, Wang J-K. Effect of long-term covering with plastic film on $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ in depth profile of brown earth. *Chinese Journal of Soil Science*, 2006, **37**(3): 443–446]
- [11] 刘顺国, 付时丰, 汪景宽, 等. 长期地膜覆盖对棕壤水分含量和储量动态变化的影响. 沈阳农业大学学报, 2006, **37**(5): 725–728 [Liu S-G, Fu S-F, Wang J-K, *et al.* Effect of long-term covering with plastic film on dynamic changes of soil water in brown earth. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2006, **37**(5): 725–728]
- [12] 赵爽, 胡江, 沈其荣. 两个水稻品种根际土壤细菌和氨氧化细菌的群落结构差异. 土壤学报, 2010, **47**(5): 939–945 [Zhao S, Hu J, Shen Q-R. Difference in community structure of bacteria and ammonia-oxidizing bacteria in rhizosphere between two different rice cultivars. *Acta Pedologica Sinica*, 2010, **47**(5): 939–945]
- [13] 任灵玲, 李秀玲, 刘灵芝. 不同施肥方式下土壤氨氧化细菌的群落特征. 中国生态农业学报, 2019, **27**(1): 11–19 [Ren L-L, Li X-L, Liu L-Z. Community characteristic of soil ammonia oxidizing bacteria after different fertilizer applications. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2019, **27**(1): 11–19]
- [14] 王慧颖, 徐明岗, 马想, 等. 长期施肥下我国农田土壤微生物及氨氧化菌研究进展. 中国土壤与肥料, 2018(2): 1–12 [Wang H-Y, Xu M-G, Ma X, *et al.* Research advances of microorganism and ammonia oxidizing bacteria under long-term fertilization in Chinese typical cropland. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2018(2): 1–12]
- [15] Chu H, Fujii T, Morimoto S, *et al.* Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**: 485–491
- [16] Zhou Z, Shi X, Zheng Y, *et al.* Abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in purple soil under long-term fertilization. *European Journal of Soil Biology*, 2014, **60**: 24–33
- [17] Di HJ, Cameron KC, Shen JP, *et al.* Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. *Nature Geoscience*, 2009, **2**: 621–624
- [18] 宋亚珩, 王媛媛, 李占明, 等. 淹水水稻土中氨氧化古菌丰度和群落结构演替特征. 农业环境科学学报, 2014, **33**(5): 999–1006 [Song Y-H, Wang Y-Y, Li Z-M, *et al.* Succession of abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea in paddy soil during flooding. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, **33**(5): 999–1006]
- [19] Zhong L, Du R, Ding K, *et al.* Effects of grazing on N_2O production potential and abundance of nitrifying and denitrifying microbial communities in meadow-steppe grassland in northern China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, **69**: 1–10
- [20] Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, *et al.* Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam under different long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, 2008, **10**: 1601–1611
- [21] 李晨华, 张彩霞, 唐立松, 等. 长期施肥土壤微生物群落的剖面变化及其与土壤性质的关系. 微生物学报, 2014, **54**(3): 319–329 [Li C-H, Zhang C-X, Tang L-S, *et al.* Effect of long-term fertilizing regime on soil microbial diversity and soil property. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, **54**(3): 319–329]
- [22] Shen JP, Zhang LM, Di HJ, *et al.* A review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chinese soils. *Frontiers in Microbiology*, 2012, **3**: 296, DOI: 10.3389/fmicb.2012.00296
- [23] 贺帅兵, 胡文革, 靳希桐, 等. 艾比湖湿地芦苇根际土壤氨氧化古菌的多样性和群落结构. 微生物学报, 2019, **59**(8): 1576–1585 [He S-B, Hu W-G, Jin X-T, *et al.* Diversity and community structure of ammonia oxidizing archaea in rhizosphere soil of reed in Ebinur Lake Wetland. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, **59**(8): 1576–1585]
- [24] Leininger S, Urich T, Schloter M, *et al.* Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, **442**: 806–809
- [25] Zhang LM, Hu HW, Shen JP, *et al.* Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *The ISME Journal*, 2012, **6**: 1032–1045
- [26] Jiang X, Hou X, Zhou X, *et al.* pH regulates key players of nitrification in paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, **81**: 9–16

作者简介 刘灵芝, 女, 1974年生, 博士, 副教授。主要从事土壤氮循环微生物研究。E-mail: liulingzhi2006@sia.edu.cn

责任编辑 张凤丽

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

