

DOI: 10.5846/stxb201402260329

张苗苗, 王伯仁, 李冬初, 贺纪正, 张丽梅. 长期施加氮肥及氧化钙调节对酸性土壤硝化作用及氨氧化微生物的影响. 生态学报, 2015, 35(19):

Zhang M M, Wang B R, Li D C, He J Z, Zhang L M. Effects of long-term N fertilizer application and liming on nitrification and ammonia oxidizers in acidic soils. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(19):

长期施加氮肥及氧化钙调节对酸性土壤硝化作用及氨氧化微生物的影响

张苗苗^{1,2}, 王伯仁³, 李冬初³, 贺纪正¹, 张丽梅^{1,*}

1 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 中国农业科学院农业部祁阳红壤生态环境重点野外科学观测试验站, 永州 426100

摘要: 本文以长期施加氮肥及添加氧化钙调节的酸性土壤为研究对象, 运用定量 PCR 和 DGGE 技术, 探讨了土壤氨氧化微生物及硝化作用对不同施肥处理及氧化钙调节的响应。长期施化学氮肥导致酸性土壤 $\text{pH}_{(\text{KCl})}$ 值 (3.35—3.47) 和硝化潜势 ($0.02\text{—}0.14\ \mu\text{g NO}_2\text{-N g}^{-1}\text{ soil h}^{-1}$) 进一步降低, 而添加 CaO 后土壤酸化得以缓解 (pH 值 $4.10\text{—}4.46$), 土壤硝化潜势 ($0.22\text{—}0.34\ \mu\text{g NO}_2\text{-N g}^{-1}\text{ soil h}^{-1}$) 显著增加。同时, 添加 CaO 处理对氨氧化古菌 (AOA) 的群落结构无明显影响, 但明显提高了各施肥处理土壤中氨氧化细菌 (AOB) 的群落多样性, 加 CaO 处理的土壤中, AOA 的数量降低而 AOB 的数量增加。这些结果表明虽然酸性土壤中 AOA 在数量和活性上占主导优势, AOB 在功能上冗余, 但当添加 CaO 后, AOA 和 AOB 对环境变化迅速作出响应, 并根据其不同的生态位需求重新分配优势地位, 二者交替作用共同驱动酸性土壤硝化作用。

关键词: 酸性土壤; 氧化钙调节; 硝化作用; 氨氧化古菌 (AOA); 氨氧化细菌 (AOB)

Effects of long-term N fertilizer application and liming on nitrification and ammonia oxidizers in acidic soils

ZHANG Miaomiao^{1,2}, WANG Boren³, LI Dongchu³, HE Jizheng¹, ZHANG Limei^{1,*}

1 Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Red Soil Experimental Station (Qiyang, Hunan province), the Ministry of Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yongzhou 426100, China

Abstract: High levels of N fertilization and acid deposition could cause soil acidification directly and indirectly. The nitrogen cycle, especially nitrification, makes a great contribution to the acidification of agricultural soils across China, which further leads to the mobilization of potentially toxic metals such as aluminum (Al) and manganese (Mn) and decrease crop yields. Chemicals (e.g., CaO) are amended as soil conditioners to relieve soil acidification. Ammonia oxidation, the rate-limiting step in the nitrification process, is driven by ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA). Increasing evidence demonstrates that pH is one of the most important factors determining the niche separation of AOA and AOB, and AOA play the more important role in nitrification of acidic soils. However, abundant AOB have been detected in acidic soils but little is known about their ecological function. In this study, the effects of long-term N fertilization practices and liming on nitrification and ammonia oxidizers in acidic soils were investigated using quantitative

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41171217, 41322007)

收稿日期: 2014-02-26; 网络出版日期: 2014-12-04

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhanglm@cees.ac.cn

PCR and DGGE methods combined with soil physiochemical analysis.

Compared with a previous study conducted 6 years ago at the same site, N fertilizer application without liming further decreased soil pH (3.35—3.47) and potential nitrification rate (PNR) ($0.02\text{--}0.14\ \mu\text{g NO}_2\text{-N g}^{-1}\text{ soil h}^{-1}$), while 2 years liming alleviated soil acidification (pH 4.10—4.46) and increased PNR ($0.22\text{--}0.34\ \mu\text{g NO}_2\text{-N g}^{-1}\text{ soil h}^{-1}$) significantly. There was a significantly positive correlation between soil pH and PNR, indicating the increase in soil pH via liming had positive effects on nitrification in acidic soils. AOA *amoA* gene copy numbers ($7.40 \times 10^7\text{--}4.08 \times 10^8$ copies/g) were significantly higher than those ($1.67 \times 10^6\text{--}2.57 \times 10^7$ copies/g) in soils that received different chemical N fertilizers. Ratios of AOA and AOB *amoA* gene abundance ranged between 10.9 and 44.3. After amending lime for two years in the N fertilizers treatment plots, AOA *amoA* gene copy numbers ($8.23 \times 10^6\text{--}4.89 \times 10^7$ copies/g) decreased to a certain degree but AOB *amoA* gene copy numbers ($1.99 \times 10^7\text{--}5.42 \times 10^7$ copies/g) increased significantly compared to corresponding fertilization treatments without liming, which in lower ratios of AOA to AOB *amoA* gene abundance (0.83—1.94). Moreover, liming showed no clear influence on AOA community structure, but significantly increased AOB community diversity. Taken together, these results indicate that although the activity and abundance of AOA was generally greater than those of AOB in acidic soils, both AOA and AOB actively responded to disturbance in acidic soils based on their niche differentiation and had different effects on nitrification of acidic soils.

Key Words: Acidic soils, Liming; Nitrification; Ammonia-oxidizing archaea (AOA); Ammonia-oxidizing bacteria (AOB)

酸性土壤(pH <5.5)在我国分布面积广泛,是我国热带亚热带经济作物如茶树、林木、果树和粮食作物的重要产地。近几十年来,因化学氮肥的过量施用和酸沉降加剧,我国农田土壤的酸度逐步升高,面积也不断增加^[1]。为了缓解土壤酸化,农业中常采用田间施加化学改良剂(如石灰(CaO))的方法来进行改良,效果显著^[2, 3]。

硝化作用是土壤氮素转化的关键过程,除影响土壤中无机氮对植物的有效性外,硝化作用对酸性土壤进一步酸化、有毒金属元素的溶解释放等都有重要影响^[1, 4-6]。氨氧化作用作为硝化作用的限速步骤,是全球氮循环的中心环节,主要由氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)^[7]和古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)^[8-10]驱动。大量分子生态学调查发现,虽然多种环境因子,包括温度、pH值、施肥、土壤类型及土地利用方式等都会影响两类氨氧化微生物的群落组成和数量,但pH值是影响其分布及功能活性的决定性因子。已有研究发现,随着pH值增加,AOA和AOB群落组成发生明显演替,AOA的数量和*amoA*基因的表达活性显著降低,AOB则呈相反趋势^[11-15]。2007年,我们对湖南祁阳红壤长期定位实验站连续16年施加不同化学肥料处理土壤中的氨氧化细菌和古菌的群落组成进行了调查,结果发现,长期施加无机氮肥显著降低了AOA和AOB的数量,并改变了AOA的群落组成,但对AOB的群落结构无显著影响,揭示了AOA可能在该酸性土壤硝化作用中起重要作用^[16]。通过稳定性同位素探测技术(stable isotope probing, SIP)等的研究,我们也证实氨氧化古菌是一些酸性土壤硝化作用的主导者^[17]。

以上研究揭示了氨氧化古菌对酸性土壤硝化作用的重要贡献,然而在多数酸性土壤中也能检测到数量相当的氨氧化细菌,但对这些酸性土壤中氨氧化细菌的存在有何生态学意义并不清楚。由于多年连续施肥,湖南祁阳红壤定位施肥实验站长期接受施化学氮肥处理的土壤pH值持续下降,土壤肥力和生产力严重受阻,该实验站于2010年将原施氮肥(N)、氮钾肥(NK)、氮磷肥(NP)、氮磷钾肥(NPK)处理的小区划分出一半进行添加氧化钙处理,以期通过添加氧化钙调节土壤pH值,改善土壤质量。本研究在2007年我们对该样地土壤研究的基础上,对持续施肥5年后以及添加CaO处理对土壤硝化作用和氨氧化细菌和古菌的影响进行了跟踪研究,以期为进一步认识酸性土壤硝化作用过程及其机制提供参考,为农田施肥及酸性土壤改良管理方式提供指导依据。

1 材料和方法

1.1 样品采集

本研究中的土壤样品采集于湖南省祁阳红壤定位施肥实验站(26°45'N, 111°52'E), 该地属于典型的亚热带季风气候, 年平均气温 18 °C, 年降水量 1300 mm。本实验共选择了 9 个处理, 包括 1990 年开始的长期施肥处理及 2010 年开始的施加氧化钙(CaO)处理, 具体情况如下: 1) 不施肥(Ctrl), 2) 氮肥(N), 3) 氮钾肥(NK), 4) 氮磷肥(NP), 5) 氮磷钾肥(NPK), 6) 氮肥加氧化钙(N+CaO), 7) 氮钾肥加氧化钙(NK+CaO), 8) 氮磷肥加氧化钙(NP+CaO), 9) 氮磷钾肥加氧化钙(NPK+CaO)。肥料用量为年施用 N 300 kg/hm²、P₂O₅ 120 kg/hm²、K₂O 120 kg/hm², N: P₂O₅: K₂O 比值为 1:0.4:0.4; 氧化钙年施用量为 2550 kg/hm²。

样品采集于 2012 年 7 月, 所采样品均为 0—20 cm 表层土壤。每个处理小区取 3 个重复, 每个重复分别取 5 个点混合而成。样品于低温保存带回实验室后, 剔除石砾和植物残根等杂物, 过 2 mm 筛处理, 一部分保存于 4 °C 冰箱用于土壤基本化学性质的测定, 其余样品放置于 -80 °C 保存, 用于分子生态学实验分析。

1.2 土壤化学指标及硝化潜势测定

土壤 pH 值的测定采用 1 mol/L KCl 溶液以水土比 2.5:1 浸提, 以 Delta 320 pH 计(Mettler-Toledo, 上海)测定。土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 以 1 mol/L KCl 按水土比 5:1 浸提后, 用连续流动分析仪(SAN++, Skalar, Holland)测定。所有样品均重复 3 次测定。

土壤硝化潜势(potential nitrification rate, PNR)测定采用氯酸盐抑制法^[18]。以水土比 4:1 向 5 g 土壤中加入含 1 mmol/L (NH₄)₂SO₄ 的磷酸盐缓冲液(NaCl 8.0 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 0.2 g/L, NaH₂PO₄ 0.2 g/L; pH 值 7.4), 并加入 10 mmol/L KClO₃ 溶液抑制亚硝酸盐的氧化。土样于 25 °C 黑暗培养 24 h 后加入 5 mL 2 mol/L KCl 溶液浸提 NO₂⁻。NO₂⁻ 以 N-(1-萘基)-乙二胺显色, 在 540 nm 波长下测定。所有样品均重复 3 次。

1.3 土壤 DNA 提取

土壤 DNA 提取以 MoBio PowerSoil™ DNA(MO BIO laboratories, CA, US)试剂盒进行提取, 称取 0.25 g 土壤按照试剂盒操作指南进行, 并略加修改: 细胞破碎在 FastPrep 上进行, 破碎速度为 5.0, 时间为 45 s。DNA 提取后于 -20 °C 保存待用, 所有 DNA 均稀释 10 倍用于下游实验。

1.4 定量 PCR 分析

氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)定量 PCR 分析均采用 SYBR Green 法, 反应在 iCycle iQ5(Bio-Rad, USA)仪器上进行。PCR 反应体系为 25 μL, 包含 12.5 μL 2 × SYBR Premix Ex Taq™(TaKaRa, Japan), 10 μmol/L 正反向引物各 0.5 μL, DNA 模板 2 μL, 其余用 ddH₂O 补足至 25 μL^[19]。定量 PCR 所用的扩增引物及反应条件见表 1。

1.5 变性梯度凝胶电泳分析

氨氧化微生物的群落结构分析采用变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)法, DGGE 在 DCode Universal Mutation Detection System(Bio-Rad, USA)中进行。AOA *amoA* 基因 PCR 扩增体系为 25 μL, 其中包括 12.5 μL 2 × Premix Ex Taq™(TaKaRa, Japan), 10 μmol/L 正反向引物各 0.5 μL, DNA 模板 2 μL, 其余用 ddH₂O 补足至 25 μL。AOB *amoA* 基因扩增体系除 10 μmol/L 正反向引物用量为 0.4 μL 外, 其余与 AOA *amoA* 反应体系相同。DGGE-PCR 反应的扩增引物及反应条件如表 1 所示。DGGE 电泳在 6% 聚丙烯酰胺胶中进行, AOA *amoA* 基因所用的变性胶浓度范围为 10%—45%, 电泳条件为 90 V, 12 h。AOB *amoA* 基因变性胶浓度范围为 30%—55%, 电泳条件为 120 V, 8 h。每个处理选取两个重复进行 DGGE 分析。

1.6 统计分析

本研究所有相关分析均采用 Pearson 相关分析; 添加 N 与 N+CaO、NK 与 NK+CaO、NP 与 NP+CaO、NPK 与 NPK+CaO 各组处理间的差异性分析采用成对数据 T 检验分析; 多组数据间的方差分析采用单因素方差分析 ANOVA。所有统计检验均用 SPSS 19 实现, P<0.05 即认为差异显著。DGGE 图谱的聚类分析以 Quantity

One 软件读取条带后以 UPGMA 方法进行。

表 1 定量 PCR 及 DGGE-PCR 中所用引物及反应程序

Table 1 Primers and reaction conditions used for Real-time PCR and PCR for DGGE

目标群落及用途 Target group and purpose	引物 Primer	序列 Sequence	反应程序 Thermal program	参考文献 Reference
AOB 定量 PCR AOB Quantitative PCR	amoA-1F amoA-2R	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	95 °C 预变性 1 min; 95 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 72 °C 30 s 后, 在 83 °C 读盘 15 s	[20]
AOB DGGE-PCR	amoA-1F-GC amoA-2R	CGCCGCGCGGCGGGCGGGCGGGG- GCGGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 之后每个循环退火温度降低 0.5 °C, 共 10 个循环; 95 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。	[19]
AOA 定量 PCR AOA Quantitative PCR	Arch-amoAF Arch-amoAR	STAATGGTCTGGCTTAGACG GCGGCCATCCATCTGTATGT	95 °C 预变性 1 min; 95 °C 变性 10 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 72 °C 延伸 1 min。	[21]
AOA DGGE-PCR	CrenamoA-23f CrenamoA-616r	ATGGTCTGGCTWAGACG GCCATCCATCTGTATGTCCA	95 °C 预变性 1 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 10 个循环; 92 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min	[17]

2 结果 (Results)

2.1 土壤化学性质及硝化潜势 (PNR)

各土样的基本化学性质及硝化潜势如表 2 所示。与对照 Ctrol 土壤相比, 所有施肥处理的土壤 $\text{pH}_{(\text{KCl})}$ 降低 (3.35—3.47)。成对数据 T 检验结果显示, 添加 CaO 后, 土壤 $\text{pH}_{(\text{KCl})}$ 显著升高 (4.10—4.46) ($t > 14$, $P < 0.05$)。所有处理土壤中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量无显著差异, 施加 N、NK、NP 肥处理中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量 (11.66—12.93 mg/kg) 显著高于其他处理土壤 (0.63—2.27 mg/kg), NPK+CaO 及 Ctrol 土壤中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量最低, 分别为 0.63 和 0.69 mg/kg。

表 2 土样的基本化学性质及硝化潜势 ($\pm$ 标准误差)

Table 2 Basic chemical properties and potential nitrification rates of sampled soils ($\pm$ standard error)

处理 Treatment	$\text{pH}_{(\text{KCl})}$	$\text{NH}_4^+\text{-N}/$ (mg/kg)	$\text{NO}_3^-\text{-N}/$ (mg/kg)	硝化潜势 (PNR) Potential nitrification rate (PNR)/ ($\mu\text{g NO}_3^-\text{-N g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$)
Ctrol	4.43	10.88 $\pm$ 0.57a	0.69 $\pm$ 0.19a	0.44 $\pm$ 0.02h
N	3.35	19.86 $\pm$ 3.08a	12.93 $\pm$ 0.34d	0.02 $\pm$ 0.00a
NK	3.41	14.44 $\pm$ 2.01a	12.46 $\pm$ 0.56cd	0.09 $\pm$ 0.00c
NP	3.42	13.30 $\pm$ 0.43a	11.66 $\pm$ 0.049c	0.06 $\pm$ 0.00b
NPK	3.47	6.75 $\pm$ 0.48a	1.94 $\pm$ 0.40ab	0.14 $\pm$ 0.00d
N+CaO	4.10	8.81 $\pm$ 0.24a	1.08 $\pm$ 0.18ab	0.27 $\pm$ 0.00f
NK+CaO	4.46	6.87 $\pm$ 0.56a	2.27 $\pm$ 0.26b	0.22 $\pm$ 0.01e
NP+CaO	4.15	12.05 $\pm$ 1.20a	1.21 $\pm$ 0.19ab	0.34 $\pm$ 0.01g
NPK+CaO	4.31	13.37 $\pm$ 1.36a	0.63 $\pm$ 0.12ab	0.29 $\pm$ 0.00f

不同字母表示处理之间的差异显著性

土壤硝化势在各施肥处理间具有显著差异。其中, Ctr01 土壤的硝化势 ($0.44 \mu\text{g NO}_2^- \text{N g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$) 最高, 其次为 NP+CaO ($0.34 \mu\text{g NO}_2^- \text{N g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$), NPK+CaO ($0.29 \mu\text{g NO}_2^- \text{N g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$) 和 N+CaO ($0.27 \mu\text{g NO}_2^- \text{N g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$)。添加 CaO 处理土壤 (N+CaO, NK+CaO, NP+CaO, NPK+CaO) 的硝化势 ($0.22\text{—}0.34 \mu\text{g NO}_2^- \text{N g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$) 均显著高于其对应的施肥处理土壤 ($0.02\text{—}0.14 \mu\text{g NO}_2^- \text{N g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$)。土壤硝化势与土壤 $\text{pH}_{(\text{KCl})}$ 呈显著正相关 ($r=0.78, P<0.05$)。这些结果表明添加 CaO, 在提高土壤 pH 值的同时显著增加了土壤硝化活性。

2.2 氨氧化微生物的丰度变化

利用实时荧光定量 PCR 技术对各处理土壤中的氨氧化细菌 (AOB) 和氨氧化古菌 (AOA) 的 *amoA* 基因丰度进行了分析, 结果如图 1 所示。成对数据 T 检验分析结果显示, 在所有未加 CaO 的处理中, AOA *amoA* 基因的丰度均显著高于 AOB ($P<0.05$), 二者的比值为 $10.9\text{—}44.3$ 。添加 CaO 后, AOA 丰度在一定程度上降低, AOB 丰度显著增加 ($P<0.05$), 使得 AOA 和 AOB 二者基因丰度相当, 无显著差异, 其比值降低至 $0.83\text{—}1.94$ 。在所有处理中, 对照土壤 AOA 丰度最高 ($1.39 \times 10^9 \text{ copies/g}$), N+CaO 土壤 AOA 丰度最低 ($5.31 \times 10^7 \text{ copies/g}$); NPK+CaO 处理土壤中 AOB 丰度最高 ($2.42 \times 10^8 \text{ copies/g}$), N 肥处理土壤中 AOB 丰度最低 ($3.34 \times 10^6 \text{ copies/g}$)。另外, 土壤硝化势与土壤中 AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度均无显著相关关系, 但与 AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度之和, 即土壤中总 *amoA* 基因丰度显著正相关 ($r=0.40, P<0.05$)。

2.3 氨氧化微生物的群落结构

氨氧化细菌 (AOB) 和氨氧化古菌 (AOA) 的群落结构以 PCR-DGGE 方法进行分析, 结果发现所有处理均容易获得足量的 AOA PCR 产物用于 DGGE 电泳。DGGE 图谱及其对应条带的聚类分析结果显示, 对照处理 Ctr01 与其它施肥处理明显分开, 单独成为一支, 表明对照处理 Ctr01 土壤中 AOA 的群落结构与其它处理存在明显差异; 所有施肥处理中, N 处理与其它处理明显分开, NP 和 NK, NPK+CaO 和 NPK, NK+CaO, NP+CaO 和 N+CaO 分别聚集成 3 个小分支 (图 2a 和 2b), 表明 AOA 的群落组成在这三组处理中存在稍小差异。

而对 AOB 来说, 施加 CaO 的所有处理均能获得足够的 PCR 产物进行 DGGE 电泳分析, 但尽管使用同样的 PCR 扩增条件, 对照处理土壤 Ctr01 及各施氮肥处理土壤中 AOB *amoA* 基因 PCR 扩增产物较弱甚至扩增不出, 在 DGGE 图谱上仅得到一些随机条带; 与不施加 CaO 的处理相比, 施加 CaO 的所有处理中 AOB 的 DGGE 条带明显增加, 并显示出较高的群落相似性, 表明施加 CaO 明显刺激了这部分氨氧化细菌的生长; 此外, NPK+CaO 处理土壤比 N+CaO, NK+CaO, NP+CaO 处理显示出更高的组成多样性 (图 3a)。对 DGGE 图谱进行的聚类分析的结果也显示, 施 N 肥处理及对照处理与其它处理明显分开, 其余处理聚积于一大分支, 其中添加 CaO 的 4 个处理又聚积成一个小分支, 且 NPK+CaO 处理与 N+CaO, NK+CaO, NP+CaO 相互分开 (图 3b)。

3 讨论

3.1 长期施肥处理及添加 CaO 对土壤性质和硝化作用的影响

长期施加 N 肥会导致土壤酸化, 对于酸性土壤而言, 进一步的土壤酸化则可能引起有毒金属元素 (如 Al^{3+} 等) 在土壤中的溶解性和迁移率增加, 降低土壤质量及肥料利用率。同时, 土壤酸化还能溶解土壤中的一

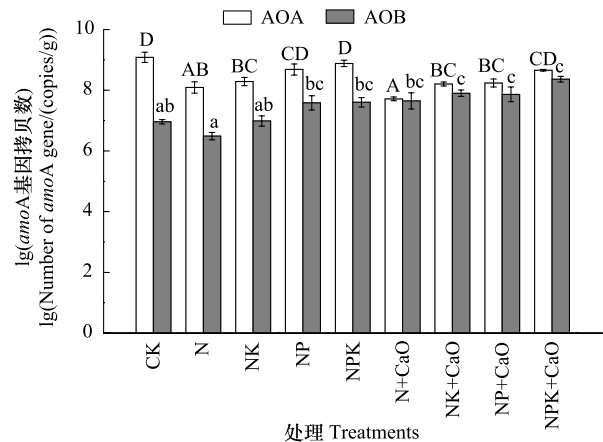


图 1 不同氮肥处理及氧化钙 (CaO) 调节处理土壤中氨氧化细菌 (AOB) 和氨氧化古菌 (AOA) *amoA* 基因丰度

Fig.1 Abundance of archaeal and bacterial *amoA* gene in soils under different N fertilizers and CaO treatments

±标准误差; 不同大写字母 AOA 丰度在各处理之间的差异显著性, 不同小写字母表示 AOB 的差异显著性

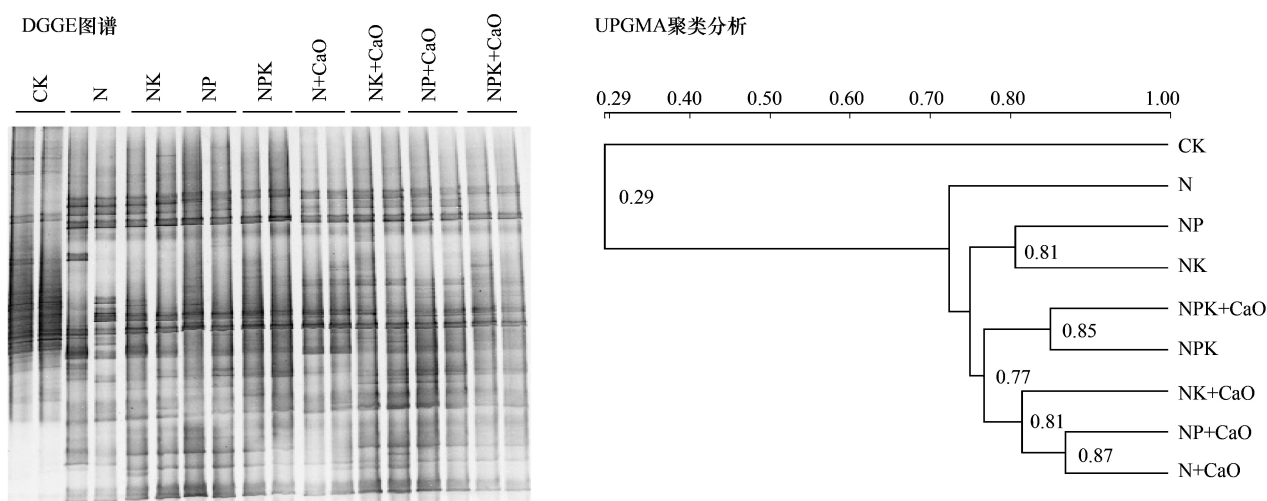


图2 不同土壤中氨氧化古菌 *amoA* 基因的 DGGE 图谱 (a) 及其 UPGMA 聚类分析 (b)

Fig.2 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles (a) and the UPGMA dendrogram (b) of ammonia-oxidizing archaeal (a) *amoA* gene in soils

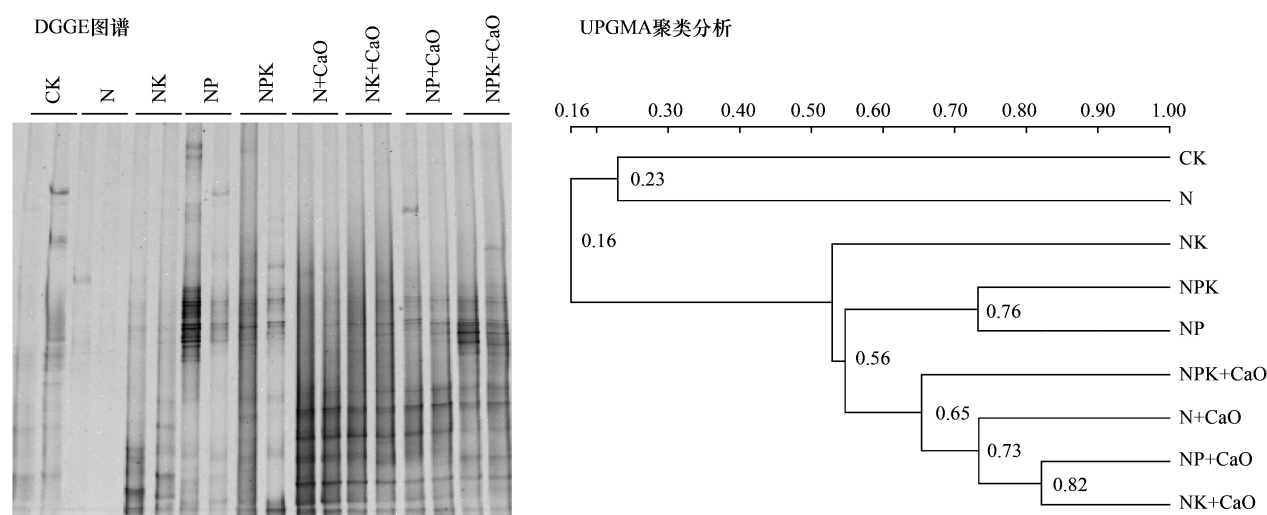


图3 不同土壤中氨氧化细菌 *amoA* 基因 DGGE 图谱 (a) 及其 UPGMA 聚类分析 (b)

Fig.3 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles (a) and the UPGMA dendrogram (b) of ammonia-oxidizing bacterial (a) *amoA* gene in soils

些营养物质如钾、钙、镁等,使土壤的营养成分随降雨和灌溉流失,造成土壤贫瘠化,影响作物生长^[5, 6]。我们于2007年对该长期施肥实验站同样的处理小区进行的研究发现,与未施肥的对照土壤相比,在连续16年施N肥处理后,N、NP、NK、NPK处理土壤 $pH_{(KCl)}$ 值显著降低(3.71—4.04),硝化潜势PNR($0.26—0.99 \mu g NO_2^- - N g^{-1} soil h^{-1}$)也显著低于对照土壤($1.49 \mu g NO_2^- - N g^{-1} soil h^{-1}$)。在本研究中,我们发现,又经过后续6年的持续施加N肥后,这些施肥处理土壤的 $pH_{(KCl)}$ 值进一步降低(3.35—3.47),硝化潜势PNR也显著降低($0.02—0.14 \mu g NO_2^- - N g^{-1} soil h^{-1}$)。但在连续两年施加CaO后,土壤 $pH_{(KCl)}$ 值显著升高(4.10—4.46),硝化潜势PNR($0.22—0.34 \mu g NO_2^- - N g^{-1} soil h^{-1}$)也显著高于连续施肥土壤。Pearson相关分析发现,土壤硝化潜势与土壤pH值呈显著正相关,这说明在酸性土壤中,土壤pH值的增加有利于土壤的硝化作用,这与之前的研究报道一致^[11]。土壤pH值与硝化作用的这种关系可能是因为,低pH值不利于 NH_3 在土壤中的存留,大量的 NH_3 离子化生成 NH_4^+ ,造成硝化作用底物不足的现象,故不利于硝化作用的进行。但也有研究发现 $pH < 5$ 的

土壤在 N 矿化速率很高时,土壤硝化速率也较高,这可能与土壤矿化作用、有机质含量及组成有关^[22]。

%1.11 氨氧化微生物对长期施氮肥及添加 CaO 的响应

在所有施肥处理土壤中,氨氧化古菌 AOA *amoA* 基因 (7.40×10^7 — 4.08×10^8 copies/g) 的丰度均显著高于氨氧化细菌 AOB (1.67×10^6 — 2.57×10^7 copies/g),二者比值为 10.9—44.3,这与我们 2007 年的调查结果一致,并与其他有关酸性土壤中 AOA 占主导优势的研究结论相符^[23-26]。已有的大量研究也表明,在大区域尺度上,pH 值是驱动氨氧化微生物多样性分布及活性的主要因子^[12]。Nicol 等^[11]对 pH 值梯度为 4.9—7.5 的草地土壤进行的研究发现,AOA 与 AOB 的数量比值随 pH 值增加而降低,AOA 的数量和 *amoA* 基因的表达活性随土壤 pH 值增加明显降低,而 AOB 则相反。我们及国内其他研究者利用高通量测序技术及稳定性同位素探测(SIP)等技术对我国一系列土壤开展的研究也发现,随土壤 pH 值增加,AOA 和 AOB 群落组成发生明显演替;在北方碱性潮土中,氨氧化细菌是硝化作用的主要驱动者,而在南方酸性土壤中,硝化作用主要由氨氧化古菌所驱动^[13, 17, 27, 28]。这些结果一致证实了 AOA 和 AOB 生态位分异的特征,即 AOB 倾向于在高氮及 pH 值中性或碱性的环境中起主导作用,而 AOA 则倾向于在酸性及低氮高有机质的土壤中占主导优势^[29-32]。

本研究结果表明,当向这些施肥处理土壤中添加 CaO 后,AOA 丰度在一定程度上降低,AOB 则显著增加,二者基因丰度比值降低到 0.83—1.94。从群落结构上来看,与对照土壤相比,长期施肥明显改变了 AOA 的群落结构组成,但在 4 个不同施氮肥处理及添加 CaO 的处理之间无明显差异。与此相反,在未添加 CaO 的施肥处理及不施肥的对照处理中,AOB 丰度较低,较难获得用于 DGGE 分析的 PCR 扩增产物。这些结果与之前有关酸性土壤中氨氧化古菌在数量及活性方面均比氨氧化细菌占优势的结论一致。AOA 适应酸性条件的可能原因包括:1) AOA 对底物的亲和力约为 AOB 的 200 倍,酸性土壤中氨离子化,多以 NH_4^+ 形式存在,能供给氨氧化所需要底物(NH_3)浓度较低,AOA 对氨的高亲和力使得其在低 pH 值土壤中更具有竞争优势^[33];2) AOA 具有独特的生物化学及遗传学特征,能够适应低 pH 及寡营养环境^[34, 35]。但另一方面,在添加 CaO 后,尽管土壤 pH 值仍处于酸性条件(4.10—4.46),AOB 的丰度和群落多样性表现出显著增加,土壤硝化潜势也显著增加,而 AOA 的数量则受到一定程度的抑制,这表明虽然酸性土壤中 AOB 在功能上冗余,但当环境条件发生微小变化时,AOA 和 AOB 均会迅速作出响应,并根据其不同的生态位需求重新分配优势地位,二者共同驱动土壤的硝化作用。此外,虽然对照处理与添加 CaO 处理土壤的 pH 非常相近,且氨态氮和硝态氮含量也非常相近,但对照处理中 AOB 的丰度显著低于 CaO 处理土壤,表明添加 CaO 对 AOB 的刺激作用不完全是由于 pH 值的增加所导致,而可能是由于 pH 增加导致土壤矿化作用增加而释放出更多可供利用的氨态氮,也可能是由于 pH 的增加导致作物地上生物量及作物根系分泌物增加,从而刺激了 AOB 的生长和硝化作用,其中的微观机理有待进一步研究。

此外,我们还发现,NPK 及 NPK+CaO 土壤中 AOB 和 AOA 群落结构与其它处理土壤也有一定差异,这说明 P、K 也会影响土壤氮循环过程及氨氧化微生物,这与之前一些研究报道结果一致^[36, 37]。

4 结论

本研究对长期施加不同氮肥处理并添加 CaO 调节的酸性红壤中硝化作用及氨氧化微生物的群落结构和丰度特征进行了研究,结果发现,连续施加含氮肥料可导致土壤 pH 值和硝化作用进一步降低,添加 CaO 则可缓解土壤酸化,显著提高土壤 pH 值和硝化潜势。AOA 的群落组成在长期施肥处理与不施肥处理间有显著不同,但在不同氮肥处理间无显著差异。添加 CaO 处理对 AOA 的群落组成无显著影响,但明显提高了各施肥处理土壤中氨氧化细菌的丰度,并增加了其群落多样性,氨氧化古菌的丰度受到一定程度的抑制。这些结果表明,虽然氨氧化古菌因自身的生理及遗传特征更适应在酸性土壤硝化作用中发挥作用,酸性土壤中 AOB 在功能上冗余,但当添加 CaO 后,AOA 和 AOB 对环境条件变化迅速作出响应,并根据其不同的生态位需求重新分配优势地位,二者交替作用共同驱动着酸性土壤的硝化作用。

参考文献 (References):

- [1] Guo J H, Liu X J, Zhang Y, Shen J L, Han W X, Zhang W F, Christie P, Goulding K W, Vitousek P M, Zhang F S. Significant acidification in major Chinese croplands. *Science*, 2010, 327(5968): 1008-1010.
- [2] Caires E F, Garbuio F J, Churka S, Barth G, Corrêa J C L. Effects of soil acidity amelioration by surface liming on no-till corn, soybean, and wheat root growth and yield. *European Journal of Agronomy*, 2008, 28(1): 57-64.
- [3] Lollato R P, Edwards J T, Zhang H. Effect of alternative soil acidity amelioration strategies on soil pH distribution and wheat agronomic response. *Soil Science Society of America Journal*, 2013, 77(5): 1831-1841.
- [4] Tang C, Rengel Z, Diatloff E, Gazey C. Responses of wheat and barley to liming on a sandy soil with subsoil acidity. *Field Crops Research*, 2003, 80(3): 235-244.
- [5] 黄国勤, 王兴祥, 钱海燕, 张桃林, 赵其国. 施用化肥对农业生态环境的负面影响及对策. *生态环境*, 2004, 13(4): 656-660.
- [6] Van Breemen N, van Dijk H F. Ecosystem effects of atmospheric deposition of nitrogen in the Netherlands. *Environmental Pollution*, 1988, 54(3/4): 249-274.
- [7] Prosser J I. Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 1989, 30: 125-181.
- [8] Könneke M, Bernhard A E, de la Torre J R, Walker C B, Waterbury J B, Stahl D A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437(7058): 543-546.
- [9] Treusch A H, Leininger S, Kletzin A, Schuster S C, Klenk H P, Schleper C. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(12): 1985-1995.
- [10] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, Halpern A L, Rusch D, Eisen J A, Wu D Y, Paulsen I, Nelson K E, Nelson W, Fouts D E, Levy S, Knap A H, Lomas M W, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers Y H, Smith H O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, 304(5667): 66-74.
- [11] Nicol G W, Leininger S, Schleper C, Prosser J I. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 2966-2978.
- [12] Shen J P, Zhang L M, Di H J, He J Z. A review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chinese soils. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 296-296.
- [13] Hu H W, Zhang L M, Dai Y, Di H J, He J Z. pH-dependent distribution of soil ammonia oxidizers across a large geographical scale as revealed by high-throughput pyrosequencing. *Journal of Soils and Sediments*, 2013, 13(8): 1439-1449.
- [14] Gubry-Rangin C, Hai B, Quince C, Engel M, Thomson B C, James P, Schloter M, Griffiths R I, Prosser J I, Nicol G W. Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(52): 21206-21211.
- [15] Yao H Y, Campbell C D, Chapman S J, Freitag T E, Nicol G W, Singh B K. Multi-factorial drivers of ammonia oxidizer communities: evidence from a national soil survey. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(9): 2545-2556.
- [16] He J Z, Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, Zheng Y M, Xu M G, Di H J. 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(9): 2364-2374.
- [17] Zhang L M, Hu H W, Shen J P, He J Z. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *The ISME Journal*, 2012, 6(5): 1032-1045.
- [18] Kurola J, Salkinoja-Salonen M, Aarnio T, Hultman J, Romantschuk M. Activity, diversity and population size of ammonia-oxidizing bacteria in oil-contaminated landfarming soil. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 250(1): 33-38.
- [19] Zhang L M, Offre P R, He J Z, Verhamme D T, Nicol G W, Prosser J I. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(40): 17240-17245.
- [20] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4704-4712.
- [21] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, Santoro A E, Oakley B B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(41): 14683-14688.
- [22] Ying J Y, Zhang L M, He J Z. Putative ammonia-oxidizing bacteria and archaea in an acidic red soil with different land utilization patterns. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(2): 304-312.
- [23] Chen X P, Zhu Y G, Xia Y, Shen J P, He J Z. Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil? *Environmental*

- Microbiology, 2008, 10(8): 1978-1987.
- [24] Gubry-Rangin C, Nicol G W, Prosser J I. Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 74(3): 566-574.
- [25] Yao H, Gao Y, Nicol G W, Campbell C D, Prosser J I, Zhang L, Han W, Singh B K. Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(13): 4618-4625.
- [26] Lehtovirta L E, Prosser J I, Nicol G W. Soil pH regulates the abundance and diversity of Group 1.1c Crenarchaeota. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 70(3): 367-376.
- [27] Xia W W, Zhang C X, Zeng X W, Feng Y Z, Weng J H, Lin X G, Zhu J G, Xiong Z Q, Xu J, Cai Z C, Jia Z J. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. The ISME Journal, 2011, 5(7): 1226-1236.
- [28] Lu L, Han W Y, Zhang J B, Wu Y C, Wang B Z, Lin X G, Zhu J G, Cai Z C, Jia Z J. Nitrification of archaeal ammonia oxidizers in acid soils is supported by hydrolysis of urea. The ISME Journal, 2012, 6(10): 1978-1984.
- [29] Erguder T H, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(5): 855-869.
- [30] Qin H L, Yuan H Z, Zhang H, Zhu Y J, Yin C M, Tan Z J, Wu J S, Wei W X. Ammonia-oxidizing archaea are more important than ammonia-oxidizing bacteria in nitrification and $\text{NO}_3\text{-N}$ loss in acidic soil of sloped land. Biology and Fertility of Soils, 2012, 49(6): 767-776.
- [31] Schleper C. Ammonia oxidation: different niches for bacteria and archaea? The ISME Journal, 2010, 4(9): 1092-1094.
- [32] Ke X B, Angel R, Lu Y H, Conrad R. Niche differentiation of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers in rice paddy soil. Environmental Microbiology, 2013, 15(8): 2275-2292.
- [33] Martens-Habbena W, Berube P M, Urakawa H, de la Torre J R, Stahl D A. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. Nature, 2009, 461(7266): 976-979.
- [34] Valentine D L. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5(4): 316-323.
- [35] He J Z, Hu H W, Zhang L M. Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils. Soil Biology and Biochemistry, 2012, 55: 146-154.
- [36] Yu W T, Xu Y G, Bi M L, Ma Q, Zhou H. Activity and composition of ammonia-oxidizing bacteria in an aquic brown soil as influenced by land use and fertilization. Pedosphere, 2010, 20(6): 789-798.
- [37] Cai Y F, Peng C, Zhao S Q, Cai A H, Li Y T. Balanced fertilization improved soil ammonia-oxidizing bacterial community in latosolic red soil. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science, 2012, 62(6): 531-540.