

DOI: 10.5846/stxb201907121469

陈竹, 郭岩彬, 孟凡乔, 邵小明, 刘宝驹, 吴文良. 施肥方式对干旱半干旱地区土壤氨氧化微生物数量和群落的影响. 生态学报, 2021, 41(11): 4577-4585.

Chen Z, Guo Y B, Meng F Q, Shao X M, Liu B J, Wu W L. Effects of long-term different fertilization regimes on the abundance and community structure of ammonia oxidizers in semi-arid ecosystem. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(11): 4577-4585.

施肥方式对干旱半干旱地区土壤氨氧化微生物数量和群落的影响

陈 竹^{1,2}, 郭岩彬¹, 孟凡乔¹, 邵小明¹, 刘宝驹¹, 吴文良^{1,*}

1 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100000

2 贵州大学农学院, 贵阳 550000

摘要: 氨氧化是硝化作用的限速步骤, 也是评估土壤氮循环和提高氮肥利用效率的重要指标。以内蒙古农牧业科学院旱作实验站长期定位实验为基础, 通过实时荧光定量 PCR 和末端限制性片段长度多态性分析, 研究了 5 种施肥方式 (单施氮肥、单施有机肥、氮磷钾配施、有机无机配施和不施肥) 对土壤氨氧化古菌 (AOA) 和氨氧化细菌 (AOB) 群落丰度、结构和活性的影响。结果表明: 单施氮肥、氮磷钾肥配施以及有机无机肥配施均能显著提高 AOB 的丰度以及土壤硝化潜势。 *Nitrosospiria* cluster 3a.1 是不施肥土壤中主要的 AOB 种群, 而施用氮肥后优势种群转变为 *Nitrosospiria* cluster 3a.2。 *Nitrosospiria* cluster 3b 的比例在施用有机肥处理土壤中显著升高。在干旱半干旱地区, 土壤 pH 和含水量是解释 AOB 群落结构变化的关键环境因子。AOA 的丰度在单独施用氮肥处理中显著升高, 但不同施肥方式对 AOA 的群落结构没有显著影响。

关键词: 干旱半干旱地区; 氨氧化古菌; 氨氧化细菌; 群落结构; 长期定位施肥

Effects of long-term different fertilization regimes on the abundance and community structure of ammonia oxidizers in semi-arid ecosystem

CHEN Zhu^{1,2}, GUO Yanbing¹, MENG Fanqiao¹, SHAO Xiaoming¹, LIU Baoju¹, WU Wenliang^{1,*}

1 College of Resources and Environment Sciences, China Agricultural University, Beijing 100000, China

2 College of Agricultural, Guizhou University, Guiyang 550000, China

Abstract: Ammonia oxidation is a rate-limiting step of nitrification and an important index to evaluate nitrogen cycling in soil. Real-time PCR, terminal restriction fragment length polymorphism and clone library analysis were used to investigate the effects of long-term different fertilization regimes on the abundance and community structure of ammonia oxidizers in a long-term localization experiment in the dry farming station of the Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences. Five treatments were compared including chemical nitrogen (N) fertilization, chemical nitrogen, phosphorous and Potassium fertilization (NPK), manure only (O), NPK plus manure (NPK+O), and no fertilizer as control. The results showed that the abundance of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and nitrification potential were significantly increased in N, NPK, and NPK+O treatments. The sequences of AOB in the control soil were mostly affiliated with genus *Nitrosospiria* clusters 3a.1. The soil treated with N increased the abundance of AOB that belonged to *Nitrosospiria*

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目 (31860115); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目 (黔教合 KY 字 [2018]100); 贵州大学引进人才科研项目 (贵大人基合字 (2016)47 号); 贵州大学线上线下混合式课程建设项目《植物营养学》

收稿日期: 2019-07-12; 网络出版日期: 2021-04-06

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wuwenl@cau.edu.cn

clusters 3a.2. In contrast, the O-treated soil showed more abundant AOB that belonged to *Nitrosospira* clusters 3b. In the semi-arid ecosystem, the soil pH and soil moisture were identified as the dominant drivers of the AOB community structure. The abundance of ammonia-oxidizing archaea (AOA) was only increased by applying of urea, while different fertilizations did not have significant effect on the AOA community structure.

Key Words: semi-arid ecosystem; ammonia-oxidizing archaea; ammonia-oxidizing bacteria; community structure; long-term fertilization

硝化作用介导铵态氮向硝态氮转化的过程,它不仅影响氮对植物的有效性,还与面源污染和温室气体排放有关^[1]。氨氧化是硝化作用的限速步骤,也是评估土壤氮循环的重要指标^[2]。氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)、氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)^[2-4]和新近发现的全程氨氧化微生物(complete ammonia oxidizer, Comammox)^[5]是氨氧化的主要参与者。AOA 是强酸性土壤中氨氧化作用的主要驱动者^[6],但 AOA 最高仅能耐受 20 mM 的铵,这远低于多数 AOB 适宜的铵浓度(50—1000 mmol/L^[7]),因此在高氮或碱性土壤中,氨氧化过程多由 AOB 主导^[8-9]。

长期定位施肥会对氨氧化微生物的活性、群落丰度和结构产生深刻影响^[10]。大量研究表明,中性和碱性土壤上施用氮肥只改变 AOB 的群落组成和丰度,酸性土壤上则影响 AOA^[11-14]。但杨亚东等^[15]和罗培宇等^[16]对水稻土和东北棕壤研究结果表明,施用氮肥后 AOA 和 AOB 的群落丰度和多样性都显著升高。这表明淹水、低温和干旱等极端环境下可能产生独特的氨氧化微生物种群,它们对施肥的响应有待进一步研究。

干旱半干旱生态系统占全球陆地面积的 41%,全球约有 38% 的人口居住于此^[17],发展和可持续发展的矛盾在这一地区非常突出。目前,对于干旱半干旱地区农田土壤氨氧化微生物影响的报道较少。本研究以内蒙古农牧业科学院旱作实验站的长期定位实验为基础,利用实时荧光定量 PCR、末端限制性片段长度多态性(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP)和克隆文库分析:1)长期施用化肥、有机肥对干旱半干旱地区农田土壤 AOB 和 AOA 群落数量、结构以及活性的影响;2)影响 AOB、AOA 群落变化的主要环境因子。

1 材料与方法

1.1 实验设计与样品采集

本研究土壤样品采自中国农业大学武川长期定位试验地(40°59'N, 110°33'E),土壤为栗钙土^[18]。该地属于温带大陆性季风气候,年平均气温 2.5℃,年降雨量 343.6 mm。试验始于 2004 年,采用马铃薯—油菜—苜蓿一年一熟轮作制。共设置 5 个处理,肥料用量及配比根据测土配方施肥确定:对照(CK,不使用肥料)、氮(N,单施尿素,60 N kg/hm²)、有机肥(O,单施羊粪,37.5 N kg/hm², 15 P₂O₅ kg/hm², 55.5 K₂O kg/hm²)、氮磷钾(NPK,尿素+磷酸二铵+氯化钾,60 N kg/hm², 45 P₂O₅ kg/hm², 30 K₂O kg/hm²)、氮磷钾+有机肥(NPK+O,尿素+磷酸二铵+氯化钾(60 N kg/hm², 45 P₂O₅ kg/hm², 30 K₂O kg/hm²)+羊粪(37.5 N kg/hm², 15 P₂O₅ kg/hm², 55.5 K₂O kg/hm²))。化肥混匀后在播种时开沟侧施,有机肥于每年作物播种前均匀撒在地表,随翻土施入。每个处理三个重复,随机区组排列,小区面积 3 m²,试验区面积 50 m²。样品于 2012 年 7 月采集,地上部作物为苜蓿。每小区用土钻随机采集 5 个土壤样品后均匀混合。土壤样品过 2 mm 筛后,用于 DNA 提取和酶活测定的样品保存于 -80℃,其余样品风干后保存待测。

1.2 土壤理化性质测定

土壤 pH 以水土比 1:2.5 测定。土壤铵态氮及硝态氮用流动分析仪(Bran-Luebbe, Germany)测定。土壤有机质和全氮用碳氮分析仪(Thermo Fischer, USA)测定。土壤磷酸盐的测定依据 Olsen 等^[19]的方法。土壤 PNR 采用氯酸钾抑制法测定^[20]。

1.3 DNA 的提取及氨氧化微生物 *amoA* 基因实时荧光定量 PCR 测定

土壤 DNA 由 0.25 g 土壤用 PowerSoil DNA Isolation Kit (Mobio, USA) 依据说明书提取。AOB 的 *amoA* 基因实时荧光定量 PCR 引物为 *amoA*-1F/*amoA*-2R^[21]。反应程序为:94℃ 预变性 120 s;94℃ 变性 45 s, 57℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 45 s, 共 35 个循环。AOA 的 *amoA* 基因实时荧光定量 PCR 引物为 *CrenamoA23f*/*CrenamoA616r*^[22]。反应程序为:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 45 s, 53℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 45 s, 共 35 个循环。反应体系均为 20 μL:10 μL SYBR Premix Ex Taq (Takara, 大连), 上下游引物各 1 μL, 2 μL BSA, 1 μL 的模板或标线 DNA, 6 μL 灭菌超纯水。标准曲线以 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因克隆制备质粒。AOA 在 83℃ 收集反应荧光信号, 氨氧化细菌在 81℃ 收集反应荧光信号以防止引物二聚体所引起的误差。反应完成后设置溶解曲线用以检验产物的特异性, 其程序为 55℃ 至 99℃ 之间, 每 1℃ 读数一次。qPCR 扩增反应在 ABI 7500 Real-time PCR (ABI, USA) 上进行。

1.4 *amoA* 基因的 T-RFLP 分析

AOB *amoA* 基因的 T-RFLP 分析用 *amoA*-2R 和 6-carboxyfluorescein (FAM) 标记的 *amoA*-1F 作为引物。PCR 程序为 94℃ 变性 5 min;然后 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。电泳检测 PCR 产物特异性, 用 PCR 产物纯化试剂盒 (Axygen, USA) 纯化。纯化产物用限制性内切酶 *Msp* I (NEB, UK) 酶切。AOA *amoA* 基因的 T-RFLP 分析用 *CrenamoA616r* 和 FAM 标记的 *CrenamoA23f* 作为引物。PCR 程序为 94℃ 变性 5 min;然后 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。电泳检测 PCR 产物特异性, 然后用 PCR 产物纯化试剂盒 (Axygen) 纯化 PCR 产物。纯化产物用限制性内切酶 *Mbo* I (NEB) 酶切。酶切产物与甲酰胺和 GeneScanTM-500 Liz (ABI) 混合。酶切片段长度用 ABI-PRISM 3030XL Genetic Analyzer (ABI, UK) 软件检测。每个峰的相对丰度用 GeneMarker version 2.2 (<http://www.softgenetics.com>) 软件进行分析。

1.5 克隆文库的构建与分析

将每个处理 3 个重复的 DNA 单独进行 PCR 扩增, 扩增体系同 1.4。每个处理的 PCR 产物等体积混合后用 *pEASY-T1* 载体 (TransGen Biotech, Beijing) 进行克隆并测序。序列由 BLAST-N 在线比对验证。AOB 和 AOA 分别构建 5 个文库, 每个文库包含 12 条序列。用 MEGA v.4.0 以 neighbor-joining 法构建进化树。

1.6 统计分析

使用 one-way ANOVA 的 Duncan's 检验在 $P < 0.05$ 水平计算各指标在处理间的差异显著性。用 Spearman 相关性指数计算各指标之间的相关性。用 R 语言 (<http://www.R-project.org>) 的“Vegan”程序包进行 ANOSIM 分析以比较处理间 AOB 和 AOA 的群落结构的相似性, 冗余分析 (redundancy analysis, RDA) 结合 BIOENV 来分析环境因子对群落的影响, 控制方差膨胀因子使其小于 10, 并用蒙特卡洛置换检验分析环境因子和群落之间的相关性。

2 结果

2.1 土壤理化性质

受长期耕作却未及时补充肥料的影响, CK 土壤中有效态营养成分 (NH_4^+ 、 NO_3^- 和有效磷) 以及 TN、TC 和 SOC 含量都显著低于其他处理 (表 1)。与 CK 相比, N 处理土壤的 TN、 NH_4^+ 和 NO_3^- 含量显著升高, 而土壤 pH 显著降低。施用有机肥处理 (O 和 NPK+O) 土壤的 TC、TN 和 SOC 含量显著高于其他处理。受磷肥施用影响, 土壤磷酸盐含量由高到低依次是 $\text{NPK}+\text{O} > \text{NPK} \approx \text{O} > \text{N} \approx \text{CK}$ 。

2.2 硝化潜式和氨氧化微生物群落丰度

施用尿素的处理 (N、NPK 和 NPK+O) 土壤的 PNR 显著高于 O 处理和 CK (图 1)。相关性分析表明, PNR 与 AOB 和 AOA 的 *amoA* 基因拷贝数分别呈极显著正相关 ($r=0.912$, $P<0.01$) 和显著正相关 ($r=0.542$, $P<0.05$; 表 2)。PNR 与 NO_3^- ($r=0.663$, $P<0.01$; 表 2) 和 NH_4^+ 含量 ($r=0.598$, $P<0.05$; 表 2) 显著正相关。

表 1 土壤理化性质
Table 1 Soil physico-chemical properties

处理 Treatment	对照 CK	氮 N	有机肥 O	氮磷钾 NPK	氮磷钾+有机肥 NPK+O
含水量 Moisture / %	7.05±0.67a	6.90±0.57a	7.54±0.27a	6.41±0.54a	7.13±0.43a
pH (H ₂ O)	7.69±0.11ab	7.58±0.09b	7.82±0.02a	7.82±0.05a	7.71±0.08ab
全碳 Total Carbon / (g/kg)	8.43±0.23c	8.99±0.86bc	12.38±0.39a	9.49±0.43b	12.25±0.48a
全氮 Total Nitrogen / (g/kg)	0.78±0.04c	0.89±0.11b	1.13±0.03a	0.90±0.05b	1.13±0.04a
碳氮比 C/N ratio	10.38±0.38a	10.13±0.28b	10.91±0.09a	10.58±0.14ab	10.86±0.31a
有机碳 Soil Organic Carbon / (g/kg)	7.65±0.25c	7.99±0.28c	10.07±0.86ab	8.79±0.28bc	11.34±0.25a
铵态氮 NH ₄ ⁺ -N / (mg/kg)	8.64±0.70b	13.31±1.51a	8.55±1.75ab	7.09±0.54b	10.54±3.97ab
硝态氮 NO ₃ ⁻ -N / (mg/kg)	8.88±0.31c	27.89±4.47a	10.84±1.36bc	10.75±1.03bc	18.85±4.59ab
磷酸盐 Phosphate / (mg/kg)	47.44±1.41c	45.36±2.85c	66.15±3.28b	66.69±1.87b	83.89±2.64a

* 处理: 不施肥 (CK); 氮 (N); 有机肥 (OM); 氮磷钾 (NPK); 氮磷钾+常量有机肥 (NPK+O)。平均值±标准误 (n=3); 同一行中所带字母不相同, 表示处理之间有显著差异性 (P<0.05)

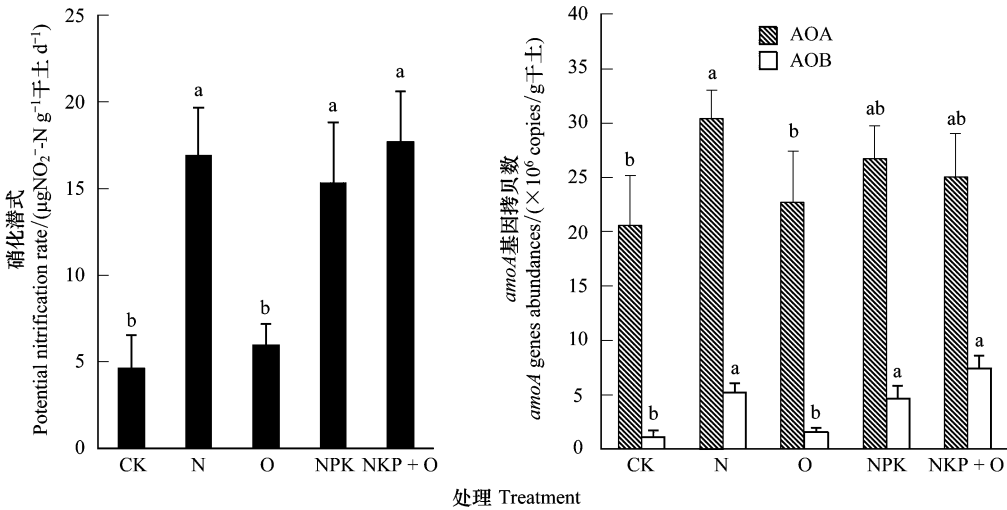


图 1 不同处理土壤的硝化潜式和氨氧化细菌和氨氧化古菌的数量

Fig.1 Potential nitrification rate, bacterial and archaea *amoA* genes abundances in different treatment

* 处理: 不施肥 (CK); 氮 (N); 有机肥 (O); 氮磷钾 (NPK); 氮磷钾+有机肥 (NPK+O); 平均值+标准误 (n=3); 不同字母表示不同处理间有显著差异性 (P<0.05)

表 2 AOA、AOB 丰度与 PNR、土壤化学性质的相关性

Table 2 Correlation coefficients between ammonia oxidizers abundance, soil properties and PNR

	含水量 Moisture	pH	全碳 Total carbon	全氮 Total nitrogen	碳氮比 C/N ratio	有机碳 Soil organic carbon	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N	磷酸盐 Phosphate	硝化潜式 PNR
氨氧化古菌 AOA	-0.477	-0.276	-0.139	-0.034	-0.545 *	-0.171	0.349	0.570 *	-0.09	0.542 *
氨氧化细菌 AOB	-0.166	-0.343	0.17	0.269	-0.402	0.345	0.443	0.641 *	0.439	0.912 **
硝化潜式 PNR	-0.042	-0.38	0.172	0.274	-0.401	0.339	0.598 *	0.663 **	0.467	

* n=15; * P<0.05; ** P<0.01

不同施肥处理土壤 AOA 的 *amoA* 基因拷贝数为 (1.65×10⁷—3.34×10⁷) 拷贝数/g 干土, 高于 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数 (5.99×10⁵—1.21×10⁷) 拷贝数/g 干土, AOA/AOB 为 19.29–3.38 (图 1)。在所有处理中, 土壤 AOB *amoA* 基因拷贝数在施用尿素处理 (N、NPK、NPK+O) 土壤中显著高于 CK 和 O 处理 (图 1), 这与

PNR 的趋势一致。N 处理土壤 AOA *amoA* 基因拷贝数显著高于 CK 和 O 处理 (图 1)。AOB ($r=0.641$, $P<0.05$; 表 2) 和 AOA ($r=0.570$, $P<0.05$; 表 2) 的 *amoA* 基因拷贝数都与 NO_3^- 含量呈显著的正相关关系。另外, AOA *amoA* 基因拷贝数与碳氮比呈显著的负相关关系 ($r=-0.545$, $P<0.05$; 表 2)。

2.3 氨氧化微生物群落结构

基于 AOA *amoA* 基因的 T-RFLP 分析得到 5 个末端限制性片段(图 2)。ANOSIM 分析表明各处理间土壤 AOA 群落间没有显著性差异 ($R=0.08$, $P=0.202$; 表 3)。基于 AOB *amoA* 基因的 T-RFLP 分析得到 4 个末端限制性片段, 包括 tRF 60 bp、tRF 156 bp、tRF 235 bp 和 tRF 256 bp (图 2)。tRF 156 bp 在 CK 处理土壤中的相对丰度显著高于其他处理, N 处理土壤中 tRF 256 bp 的相对丰度最高。O 处理土壤中 tRF 60 bp 的相对丰度显著高于其他处理。ANOSIM 分析表明各处理间土壤 AOB 群落都有显著性差异 ($P<0.05$; 表 3)。

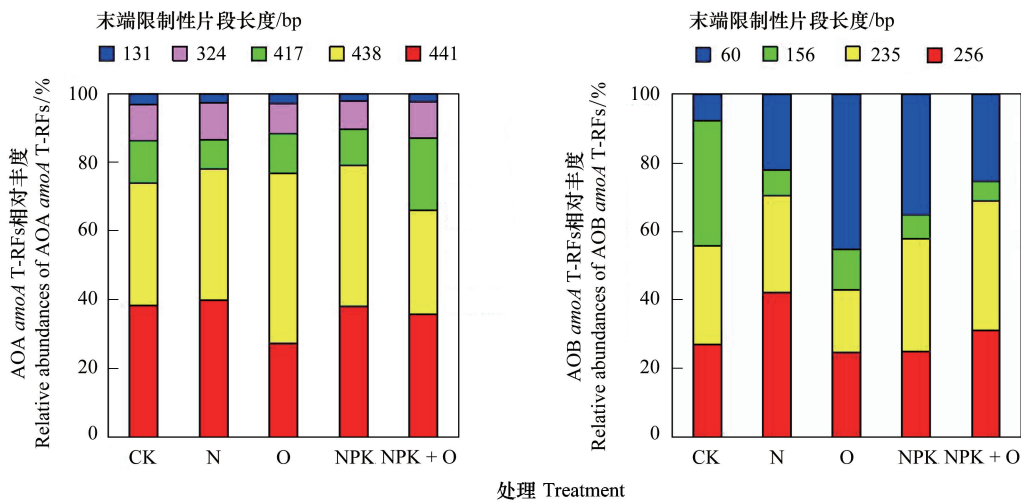


图 2 不同处理中土壤氨氧化古菌和氨氧化细菌的群落结构

Fig.2 T-RFLP fingerprints of the archaea and bacterial *amoA* gene fragments in different treatment

* 平均值+标准误 ($n=3$)

表 3 氨氧化细菌和古菌群落的 ANOSIM 分析

Table 3 ANOSIM *R* and *P* values for comparisons of ammonia-oxidizer communities using the T-RFLP data

	AOA 氨氧化古菌		AOB 氨氧化细菌	
	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>
对照-氮 CK-N	0.2	0.077	1	0.005
对照-有机肥 CK-O	0.0222	0.409	0.674	0.005
对照-氮磷钾 CK-NPK	0.0222	0.294	0.882	0.002
对照-氮磷钾+有机肥 CK-NPKO	0.2593	0.05	0.773	0.001
氮-有机肥 N-O	0.4074	0.625	0.822	0.004
氮-氮磷钾 N-NPK	0.2	0.322	1	0.004
氮-氮磷钾+有机肥 N-NPKO	0.763	0.232	0.437	0.003
有机肥-氮磷钾 O-NPK	0.1111	0.15	0.526	0.002
有机肥-氮磷钾+有机肥 O-NPKO	0.437	0.003	0.496	0.017
氮磷钾-氮磷钾+有机肥 NPK-NPKO	0.437	0.004	0.319	0.044
所有处理 Total	0.08	0.202	0.619	0.001

通过构建 AOB 文库, 检测到 4 个 tRF 片段, 包括 tRF 256 bp、tRF 235 bp、tRF 156 bp 和 tRF 62 bp (图 3)。系统发育树表明所有序列都属于亚硝化螺菌 (*Nitrosospira*), 主要分为 *Nitrosospira* Cluster 3a.1、Cluster

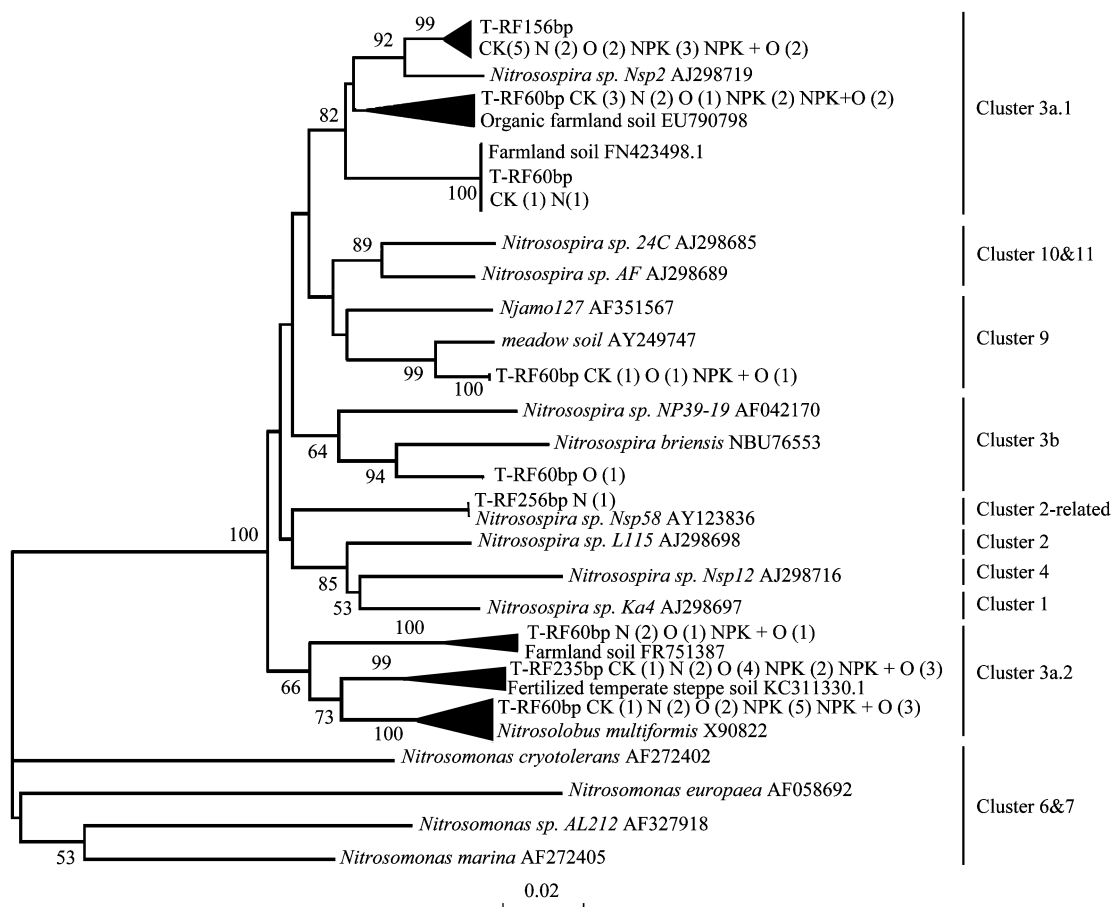


图3 不同处理中氨氧化细菌 *amoA* 基因的遗传进化树

Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree of the bacterial *amoA* sequences in different fertilization regimens

3a.2、Cluster 3b、Cluster 9 和 Cluster 2-related。CK 土壤中主要种群为 *Nitrososphaera* Cluster 3a.1 (75%),而在 N、O、NPK 和 NPK+O 处理的土壤中 *Nitrososphaera* Cluster 3a.2 的比例更高(>50%)。属于 *Nitrososphaera* Cluster 3b 的序列仅在 O 处理的土壤中检测到,其模拟酶切 tRF 片段大小为 60 bp。仅在 N 处理的土壤中发现模拟酶切 tRF 片段大小为 256 bp 的序列,它与 *Nitrososphaera* sp. Nsp58 (Cluster 2-related) 有很高的相似性 (97% sequence identity)。RDA 和 BIOENV 分析表明 pH 和土壤含水量可以完全解释 AOB 群落的变化 (100%),是影响 AOB 群落结构变化的关键因子 ($\rho=0.179$, $Pr < 0.05$) (图4)。通过构建 AOA 文库,检测到 7 个 tRF 片段,包括 tRF75 bp、tRF 131 bp、tRF 324 bp、tRF 417 bp、tRF 438 bp、tRF 441 bp 和 tRF 550 bp,系统发育树表明所有序列都属于 Cluster I. 1b (*Nitrososphaera*, 图5)。

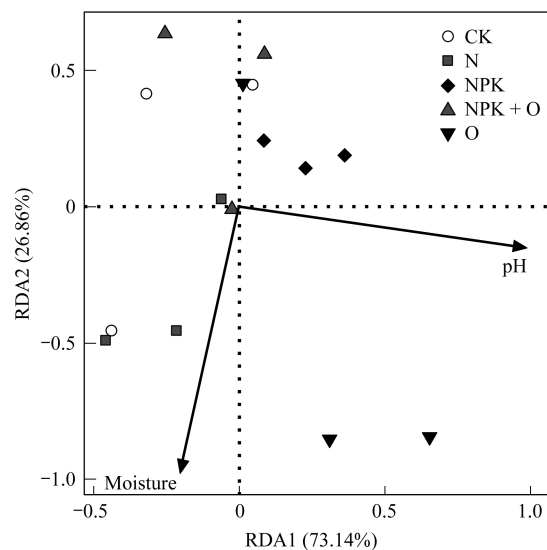
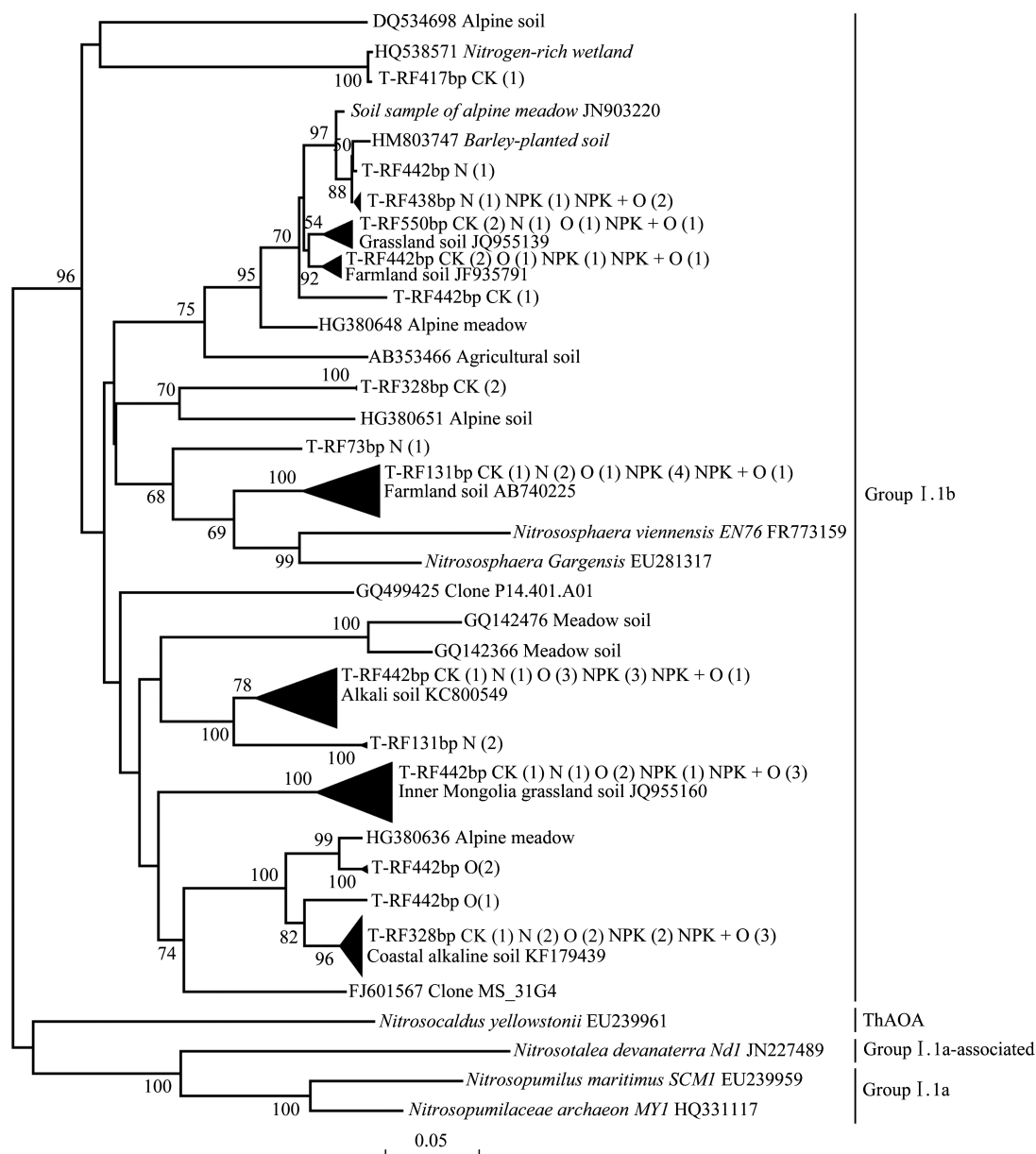


图4 不同土地利用方式下土壤氨氧化细菌群落结构 RDA 分析
Fig.4 RDA of soil parameters effect on ammonia-oxidizing bacterial communities using the T-RFLP data

* 不施肥 (CK); 氮 (N); 有机肥 (O); 氮磷钾 (NPK); 氮磷钾+有机肥 (NPK+O)

图5 不同处理中氨氧化古菌 *amoA* 基因的遗传进化树Fig.5 Neighbor-joining phylogenetic tree of the archaea *amoA* sequences in different fertilization regimens

3 讨论

不同施肥处理土壤 AOA *amoA* 基因拷贝数在 $(1.65 \times 10^7 - 3.34 \times 10^7)$ 拷贝数/g 干土之间, 高于 AOB *amoA* 的基因拷贝数 $(5.99 \times 10^5 - 1.21 \times 10^7)$ 拷贝数/g 干土, 这与在潮土^[13]、碱性壤土^[11]、红壤^[12] 上的研究结果一致。多数研究表明, 碱性土壤中施用氮肥不影响 AOA 群落丰度^[11, 23], 但在本研究中, 无论施用化肥还是有有机肥, AOA 数量都有升高的趋势, 其中, 单施尿素处理土壤 AOA 数量显著高于 CK (图 1), 这与 Hu 等^[24] 在干旱半干旱草原上的研究结果一致。在干旱环境中, 极低的土壤含水量会阻断物质传递, 受根系和微生物吸收铵时分泌氢离子影响, 土壤中可能形成大量利于 AOA 繁殖的酸性微环境。

N、NPK 和 NPK+O 处理土壤的 AOB *amoA* 基因拷贝数和 PNR 显著高于 CK (图 1), 这与 Shen^[11]、Cui^[23] 等在碱性土壤上的结果一致, 表明施用化肥后会促进 AOB 的增长, 增大硝态氮淋洗的风险。AOB *amoA* 基

因克隆文库的结果表明, 93%以上的序列都属于 *Nitrosospira* cluster 3 (图 4)。*Nitrosospira* cluster 3 在农田土壤 AOB 群落中的主导地位已经被广泛验证^[1,10]。T-RFLP 分析和文库分析均表明, *Nitrosospira* cluster 3a.1 是 CK 处理中的优势种群, 而施用氮肥后, 优势种群转变为 *Nitrosospira* cluster 3a.2 (图 2, 图 3)。这与 Guo^[25] 和 Chen^[26] 等的研究结论一致。与 CK 相比, 施用有机肥没有增加 AOB *amoA* 基因拷贝数 (图 1)。有机肥中的铵态氮矿化缓慢, 而且有机肥的施用可能促使其他土壤微生物生长并与 AOB 竞争无机氮^[27-28]。值得注意的是, *Nitrosospira* cluster 3b 的比例在 O 处理土壤中显著升高 (图 2, 图 3), 表明与 *Nitrosospira* cluster 3a 相比, *Nitrosospira* cluster 3b 更适应有机氮源^[12,29]。

BIOENV 和 RDA 分析表明 pH 和含水量是解释 AOB 群落结构的最佳环境因子组合。对大肠杆菌 *E.coli* 氨转运膜蛋白 *amtB* 的研究发现, *amtB* 只能转运 NH_3 而不能转运 NH_4^+ ^[30]。pH 降低时, NH_3 会被离子化形成 NH_4^+ 从而降低了氨对 AOB 的有效性。Hu 等^[24] 的研究表明, 只有在供水条件下, 施肥才能改变干旱地区土壤氨氧化微生物的群落结构和丰度。在干旱缺水条件下, 施用的肥料会因无法溶解而难以被 AOB 所利用。此外, 无论尿素还是有机氮都需经过微生物代谢才能形成氨, 而土壤含水量直接影响微生物的活性。总的来说, 在干旱半干旱地区, 土壤 pH 和含水量都可以通过改变氨的生物有效性来影响氨氧化微生物的群落结构。

参考文献 (References):

- [1] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 485-529.
- [2] Prosser J I. Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 1990, 30: 125-181.
- [3] 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.
- [4] Braker G, Conrad R. Diversity, structure, and size of N_2O -producing microbial communities in soils-what matters for their functioning? *Advances in Applied Microbiology*, 2011, 75: 33-70.
- [5] Van Kessel M A H, Speth D R, Albertsen M, Nielsen P H, Op Den Camp H J M, Kartal B, Jetten M S M, Lüscher S. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 2015, 528(7583): 555-559.
- [6] 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.
- [7] Hatzenpichler R. Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(21): 7501-7510.
- [8] Di H J, Cameron K C, Shen J P, Winefield C S, O'Callaghan M, Bowatte S, He J Z. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. *Nature Geoscience*, 2009, 2(9): 621-624.
- [9] Jia Z J, Conrad R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1658-1671.
- [10] 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.
- [11] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, Zhang J B, He J Z. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1601-1611.
- [12] 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.
- [13] 杨亚东, 张明才, 胡君蔚, 张凯, 胡跃高, 曾昭海. 施氮肥对华北平原土壤氨氧化细菌和古菌数量及群落结构的影响. *生态学报*, 2017, 37(11): 3636-3646.
- [14] Liu H Y, Li J, Zhao Y, Xie K X, Tang X J, Wang S X, Li Z P, Liao Y L, Xu J M, Di H J, Li Y. Ammonia oxidizers and nitrite-oxidizing bacteria respond differently to long-term manure application in four paddy soils of south of China. *Science of the Total Environment*, 2018, 633: 641-648.
- [15] 杨亚东, 宋润科, 赵杰, 王培欣, 许晓玲, 曾昭海. 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.

- [16] 罗培宇, 樊耀, 杨劲峰, 葛银凤, 蔡芳芳, 韩晓日. 长期施肥对棕壤氨氧化细菌和古菌丰度的影响. 植物营养与肥科学报, 2017, 23(3): 678-685.
- [17] Schimel D S. Drylands in the earth system. Science, 2010, 327(5964): 418-419.
- [18] 王立为, 安萍莉, 潘志华, 赫迪, 董智强. 半干旱区气候变化背景下近 20 年内蒙古武川县耕地质量变化. 农业工程学报, 2013, 29(11): 224-231.
- [19] Olson S R, Dean L A, Phosphorus//Black C A, Evans D D, White J L, Engsmiager L E, Clark F E, eds. Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties. Madison: American Society of Agronomy, 1965: 1035-1048.
- [20] Kurola J, Salkinoja-Salonen M, Aarnio T, Hultman J, Romantschuk M. Activity, diversity and population size of ammonia-oxidising bacteria in oil-contaminated landfarming soil. FEMS Microbiology Letters, 2005, 250(1): 33-38.
- [21] Rothauwe 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.
- [22] Tourna M, Freitag T E, Nicol G W, Prosser J I. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. Environmental Microbiology, 2008, 10(5): 1357-1364.
- [23] Cui P Y, Fan F L, Yin C, Song A L, Huang P R, Tang Y J, Zhu P, Peng C, Li T Q, Wakelin S A, Liang Y C. Long-term organic and inorganic fertilization alters temperature sensitivity of potential N_2O emissions and associated microbes. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 93: 131-141.
- [24] Hu H W, Macdonald C A, Trivedi P, Holmes B, Bodrossy L, He J Z, Singh B K. Water addition regulates the metabolic activity of ammonia oxidizers responding to environmental perturbations in dry subhumid ecosystems. Environmental Microbiology, 2015, 17(2): 444-461.
- [25] Guo J J, Ling N, Chen H, Zhu C, Kong Y L, Wang M, Shen Q R, Guo S W. Distinct drivers of activity, abundance, diversity and composition of ammonia-oxidizers: evidence from a long-term field experiment. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 115: 403-414.
- [26] Chen Z, Wu W L, Shao X M, Li L, Guo Y B, Ding G C. Shifts in abundance and diversity of soil ammonia-oxidizing bacteria and archaea associated with land restoration in a semi-arid ecosystem. PLoS One, 2015, 10(7): e0132879.
- [27] Shi W, Norton J M. Microbial control of nitrate concentrations in an agricultural soil treated with dairy waste compost or ammonium fertilizer. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(10): 1453-1457.
- [28] Strauss S L, Reardon C L, Mazzola M. The response of ammonia-oxidizer activity and community structure to fertilizer amendment of orchard soils. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 68: 410-418.
- [29] Fan F L, Yang Q B, Li Z J, Wei D, Cui X A, Liang Y C. Impacts of organic and inorganic fertilizers on nitrification in a cold climate soil are linked to the bacterial ammonia oxidizer community. Microbial Ecology, 2011, 62(4): 982-990.
- [30] Khademi S, Stroud R M. The Amt/MEP/Rh family: structure of AmtB and the mechanism of ammonia gas conduction. Physiology, 2006, 21(6): 419-429.