

DOI: 10.5846/stxb202106011443

蔡玉佳, 沈菊培, 张成军, 冯虞彦, DI Hongjie, 贺纪正. 不同土地利用方式土壤氨氧化微生物和反硝化微生物时空分布特征. 生态学报, 2022, 42 (14): 5847-5858.

Cai Y J, Shen J P, Zhang C J, Feng Y Y, DI Hongjie, He J Z. Spatial-temporal patterns of soil ammonia oxidizer and denitrifier bacteria under different land-use types. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(14): 5847-5858.

不同土地利用方式土壤氨氧化微生物和反硝化微生物时空分布特征

蔡玉佳^{1,2}, 沈菊培^{1,*}, 张成军³, 冯虞彦⁴, DI Hongjie⁵, 贺纪正¹

1 福建师范大学, 地理科学学院, 福州 350007

2 西交利物浦大学, 健康和环境科学系, 苏州 215123

3 北京农林科学院, 植物营养与资源研究所, 北京 100097

4 林业大学, 环境科学与工程学院, 北京 100083

5 新西兰林肯大学, 土壤与环境研究中心, Canterbury 7674

摘要: 研究不同土地利用方式下氮循环相关微生物在不同土壤剖面的分布, 可为认识和理解土壤氮转化过程提供科学依据。土壤氨氧化微生物和反硝化微生物在调节氮肥利用率、硝态氮淋溶和氧化亚氮(N_2O)排放等方面有着重要作用。以北京郊区农田和林地两种土地利用方式为研究对象, 分析土壤氨氧化潜势和亚硝酸盐氧化潜势在 0—100 cm 土壤剖面上的季节分布(春季和秋季), 并通过实时荧光定量 PCR 方法表征土壤氨氧化和反硝化微生物的时空分布特征。结果表明, 农田土壤氨氧化潜势、亚硝酸盐氧化潜势、氨氧化微生物和反硝化微生物丰度均显著高于林地土壤, 且随土壤深度增加而显著降低。除氨氧化古菌 *amoA* 基因丰度在不同季节间无显著差异外, 春季土壤氨氧化细菌(*amoA* 基因)、反硝化微生物 *nirS*、*nirK* 和典型 *nosZ I* 基因的丰度均显著高于秋季。土壤有机质、总氮、 NH_4^+-N 、 $NO_3^- -N$ 含量与氨氧化微生物和反硝化微生物的功能基因丰度显著相关。综上, 不同土地利用方式下土壤氮循环相关微生物的丰度与土壤氮素的可利用性和转化过程紧密相关, 研究结果对土壤氮素利用和养分管理提供了重要的参考依据。

关键词: 土地利用; 氨氧化微生物; 反硝化微生物; 土壤剖面; *amoA* 基因; 季节变化

Spatial-temporal patterns of soil ammonia oxidizer and denitrifier bacteria under different land-use types

CAI Yujia^{1,2}, SHEN Jupei^{1,*}, ZHANG Chengjun³, FENG Yuyan⁴, DI Hongjie⁵, HE Jizheng¹

1 School of Geographical Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

2 Department of Health and Environmental Science, Xi'an Jiaotong-Liverpool University, Suzhou 215123, China

3 Institute of Plant Nutrition and resources, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

4 College of Environmental Science and Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

5 Centre for Soil and Environmental Research, Lincoln University, Canterbury 7674, New Zealand

Abstract: Land use changes can affect soil nitrogen (N) transformation and greenhouse gas emission. Characterizing the distribution patterns of N-related microorganisms in different land uses along the soil profile provides significant information for understanding N cycling in ecosystems. Soil ammonia oxidation and denitrification play an important role in regulating nitrogen use efficiency, nitrate leaching and N_2O emission in soils. Ammonia oxidation, the conversion of ammonia to

基金项目: 科技部政府间合作项目(2017YFE0109800); 国家自然科学基金项目(32171642, 41930756)

收稿日期: 2021-06-01; 采用日期: 2021-11-25

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jpshen@fjnu.edu.cn

nitrite, is the critical step of nitrification and mainly performed by ammonia oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB). The *amoA* gene has been used as a marker for both AOA and AOB for soil samples, while genes that encode key enzymes in nitrate reduction processes include nitrite reductase genes (*nirS* and *nirK*), nitrous oxide reductase gene (*nosZ*), and so on. Denitrification is a key process for controlling soil N availability and greatly influenced by land use change. However, the effect of land use conversion on the ammonia oxidization and denitrification are not well documented. This study aimed to investigate the spatial-temporal patterns of soil nitrification rate under different land-use types as well as the abundance of ammonia oxidizing microorganisms and denitrifiers using real-time PCR approach in spring and autumn. Soil samples were collected from maize land and woodland along the 0—100 cm soil depth in the suburban district of Beijing. Results showed that the potential ammonia oxidation (PAO), potential nitrite oxidation (PNO) rates, the abundance of N-related genes in maize land were significantly higher than those in woodland, which all showed a decreasing trend along the soil depth. Seasonal change had great impact on soil PNO, while no significant effects on PAO. The abundance of AOB *amoA*, denitrifiers *nirS*, *nirK* and *nosZ* I genes in spring was significantly higher than those in autumn, while AOA *amoA* abundance remained relatively stable across different seasons. The ratio of (*nirS*+*nirK*)/*nosZ* I reached the highest in the deep soil, indicating high capacity of denitrification. Correlation analysis found that soil organic matter, total N, ammonium and nitrate contents were positively correlated with the abundance of N-related genes. The relative contribution of specific N-related communities to soil nitrogen retention in soils merits further attention. In summary, the variation of ammonia oxidizing microorganisms and denitrifier abundance were closely related with soil available nitrogen contents and nitrification rates, which provides important information for soil nitrogen use and management in agricultural system. The performance of microorganisms in deep soil shed new light into understanding the denitrification process in the future studies.

Key Words: land use; ammonia oxidizing microorganisms; denitrifiers; soil depth profile; *amoA* gene; seasonal variation

氮是植物生长的重要营养元素之一,对农业生态系统具有重要作用。硝化和反硝化过程是氮循环主要过程,均为微生物所驱动,两者共同调节植物和微生物可利用氮含量,也是土壤 N_2O 产生的主要途径^[1]。氮循环过程受多种因素的影响,包括气候,土壤类型,施肥和土地利用方式等^[2-3]。土地利用方式通过改变土壤理化性质和养分有效性等影响地上地下生态系统功能。Shen 等^[4]研究了酸性红壤在 5 种不同土地利用方式下古菌和氨氧化微生物,发现土地利用方式显著影响古菌群落结构,且氨氧化古菌 (Ammonia oxidizing archaea, AOA) 对土地利用方式变化的响应比氨氧化细菌 (Ammonia oxidizing bacteria, AOB) 敏感。Liu 等^[5]研究发现灌区撂荒地和农耕地表层和底层土壤氮转化速率和氨氧化微生物数量存在显著差异,农耕地土壤的 AOA 和 AOB 数量显著高于撂荒地。Zulkarnaen 等^[6]研究了我国亚热带红壤地区林地和旱地农田土壤中的硝化作用,结果表明旱地土壤 AOA 和 AOB 数量和净消化速率高于林地土壤,但二者的 N_2O 排放速率没有显著差异。可见,土地利用方式的改变对土壤硝化过程的影响还没有统一的定论,特别对驱动氨氧化和反硝化过程的微生物群落的季节影响还有待深入^[4]。本文主要对比分析农田和林地两种土地利用方式下氨氧化微生物和反硝化微生物的季节变化特征,可为预测土壤硝酸盐淋溶和环境氮损失提供参考。

土壤是异质性较高的体系,其生物和化学性质在不同剖面上存在显著差异。深层土壤氧含量较低,温度变化小,土壤溶液或水分停留时间较长^[7]。在灌溉和降水的水力驱动下,硝酸盐和活性溶解性有机碳组分将向深层土壤迁移,改变深层土壤养分组成^[8-9],进而影响土壤微生物群落。由于表层土壤的微生物生物量大,活性高,当前对其生物地球化学过程的研究给予了极高的关注。有研究表明深层土壤储存着大量的有机碳,且具有相当丰富和多样的土壤微生物。40—200 cm 土壤的微生物量可占 200 cm 土壤剖面微生物全量的 35%,这些深层土壤微生物在土壤成土过程、污染物降解和维持地下水水质等生态功能方面具有重要作用^[10]。因此,研究不同土地利用方式下硝化、反硝化微生物沿土壤剖面的动态变化对认识硝酸盐的垂直淋溶过程具有重要的实践指导意义。

目前对不同土地利用方式下土壤氮转化过程及微生物机制已有不少研究,但对土壤硝化和反硝化微生物的时空分布特征的认识还不够。本文通过采集华北平原典型潮土两种土地利用方式 0—100 cm 的剖面样品,研究玉米地和林地土壤氨氧化微生物和反硝化微生物丰度垂直分布特征,并探讨其与剖面土壤硝酸盐的关系,旨在为调控和减少硝酸盐淋溶风险、降低土壤 N_2O 排放提供重要的理论指导。

1 材料与方法

1.1 样品采集

采样地点位于北京市延庆区某奶牛养殖场附近的玉米地和邻近的次生林地(40°29'N, 115° 56'E),土壤类型均为粉砂质粘壤土(美国制),容重为 1.31 g/cm^3 。该地区属于典型大陆性季风气候,年平均温度为 8°C ,年平均降水量为 400—500 mm,降水集中在 7—9 月(夏季),占全年降水量的 70%^[11]。样地附近某奶牛养殖场已经营十年,圈养奶牛 200 多头,每年所产牛粪(约 4000 t)作为基肥施用于临近玉米地。本研究选取了该处理下大小一致的三块玉米地(200 m×200 m),同时采集了邻近未施用牛粪的次生林林地土壤。该次生林在 2004 年实施退耕还林之前的土地利用方式和土壤母质与玉米地一致。采样时间为 2018 年春季玉米种植之初(5 月初)和秋季收割之后(9 月底)。

采用“S”型采样法在每块地选取 5 个采样点,用管型土钻采集 0—20、20—40、40—60、60—80、80—100 cm 深度的土壤,每层 5 个采样点分别混合均匀为一个土壤样品,共采集得到 60 个土壤样品(即 2 个土地利用方式×3 个重复×5 个土层×2 个季节)。去除土壤样品中的植物残体和碎石后于采集当天送至实验室,过 2 mm 筛后分为两部分:一部分存于 4°C 冰箱用于土壤氨氧化潜势和亚硝酸盐氧化潜势测定和后续土壤理化分析;另一部分存于 -40°C 冰箱,用于提取土壤 DNA。

1.2 土壤基本性质测定

土壤 pH 使用 pH 计(METTLER TOLEDO FE20)以土水比 1:1 测定。土壤有机质测定采用低温外热重铬酸钾氧化-比色法。利用元素分析仪(Vario EL III, Elementar)上测定土壤总氮含量。土壤溶解性有机碳和溶解性有机氮含量的测定过程如下:称取 5.0 g 鲜土用 $0.5 \text{ mol/L K}_2\text{SO}_4$ 溶液以 1:5 的土水比浸提,离心过滤后,在总有机碳/总氮分析仪(Multi N/C Model 3100, Analytic Jena, Germany)上测定。土壤铵态氮和硝态氮用 1 mmol/L KCl 溶液以 1:5 的土水比浸提,离心过滤后,流动分析仪(AA3, SEAL, Germany)测定。土壤基本性质见表 1。

1.3 土壤氨氧化潜势和亚硝酸盐氧化潜势测定

根据 Kurola 等^[12]的方法测定氨氧化潜势(Potential ammonia oxidation, PAO)。简而言之,称取 5.0 g 鲜土,加入 20 mL $1 \text{ mmol/L (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4$ 磷酸缓冲溶液(含 50 mg/L KClO_3),在 25°C 条件下振荡培养 24 h。使用格氏试剂分光光度法测定溶液 NO_2^- -N 浓度,在 530 nm 处读取吸光值。以单位时间(h)单位干土(kg)内生成的 NO_2^- -N 的量表示土壤氨氧化潜势(mg NO_2^- -N ($\text{kg 干土})^{-1} \text{ h}^{-1}$)。

亚硝酸盐氧化潜势(Potential nitrite oxidation, PNO)的测定参考 Attard 等^[13]。即取 5.0 g 鲜土,加入 30 mL $5.0 \text{ mg NaNO}_2 \text{ kg}^{-1}$ 干土/磷酸盐缓冲溶液,在 28°C 条件下振荡培养 7 h。培养期间,分别在 0、2 h 和 7 h 时进行破坏性取样,测定溶液中的 NO_2^- -N 浓度。在 7 h 内的 NO_2^- 的浓度变化呈线性,且 7 h 后溶液中的 NO_2^- -N 浓度范围在 $1.0\text{—}3.0 \mu\text{g N/kg 干土}$ 。以单位时间(h)单位干土(kg)内消耗的 NO_2^- -N 的量表示土壤亚硝酸盐氧化潜势(mg NO_2^- -N ($\text{kg 干土})^{-1} \text{ h}^{-1}$)。

1.4 土壤 DNA 提取

称取 0.50 g 冷冻样品,利用土壤 DNA 试剂盒(DNeasy Power Soil Kit, QIAGEN, Germany)根据说明书提取土壤 DNA 并在 NanoDrop ND-1000 分光光度计(NanoDrop, Thermo Scientific, USA)上测定 DNA 浓度和纯

度,随后保存于-40 °C下用于后续分析。

表 1 春秋两季玉米地和林地土壤剖面基本性质

Table 1 Soil chemical properties in maize land and woodland along the soil profile in spring and autumn

季节 Season	土地利用 Land-use	土层 Soil depth/ cm	含水量 Water content/%	pH (H ₂ O)	土壤 有机质 SOM /(g/kg)	总氮 TN /(g/kg)	碳氮比 C/N ratio	溶解性 有机碳 DOC /(mg/kg)	溶解性 有机氮 DON /(mg/kg)	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N /(mg/kg)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N /(mg/kg)
春季 Spring	玉米地	0—20	18.9	8.38	28.3	1.84	8.5	124	89.1	3.02	172.1
		20—40	19.4	8.60	19.6	0.95	11.2	76.6	56.7	1.22	70.3
		40—60	18.4	8.70	10.7	0.49	11.8	43.0	35.8	1.20	39.8
		60—80	18.7	8.71	9.9	0.40	13.7	33.3	26.9	1.21	38.1
		80—100	19.9	8.83	6.6	0.27	13.9	28.1	13.9	1.09	20.4
	林地	0—20	14.5	8.47	19.7	0.89	12.0	42.9	13.5	0.19	12.3
		20—40	15.6	8.65	13.0	0.53	13.8	25.4	7.2	0.27	3.64
		40—60	15.6	8.75	10.6	0.38	15.5	12.2	4.7	0.30	2.54
		60—80	12.7	8.71	6.1	0.22	15.4	8.8	5.5	0.03	4.55
		80—100	15.9	8.73	6.7	0.19	19.0	12.6	5.5	0.28	8.56
秋季 Autumn	玉米地	0—20	12.4	8.35	19.0	1.43	7.7	99.3	85.6	3.43	38.1
		20—40	12.1	8.54	13.5	0.91	8.5	84.1	59.8	3.04	44.9
		40—60	11.5	8.60	7.7	0.49	9.0	44.9	48.9	2.29	40.9
		60—80	13.5	8.62	6.4	0.37	10.1	32.5	43.2	1.97	46.9
		80—100	12.2	8.52	4.9	0.31	9.0	22.4	51.2	2.27	50.4
	林地	0—20	15.6	8.46	13.5	0.84	9.1	44.6	10.8	0.67	2.67
		20—40	12.8	8.71	9.2	0.43	12.5	23.9	5.7	0.30	1.02
		40—60	13.6	8.88	8.3	0.36	13.4	14.1	4.2	0.42	0.64
		60—80	12.9	9.09	6.3	0.22	16.3	14.6	3.7	0.44	0.54
		80—100	12.5	8.93	5.6	0.20	15.9	13.2	3.3	0.45	0.62

SOM:土壤有机质 Soil organic matter;TN:总氮 Total nitrogen;DOC:溶解性有机碳 Dissolved organic carbon;DON:溶解性有机氮 Dissolved organic nitrogen

1.5 土壤细菌和氮功能基因丰度测定

通过实时荧光定量 PCR 方法,在 LightCycler 480II (Roche, Switzerland) 上测定细菌 16S rRNA 基因、AOA *amoA*、AOB *amoA*、反硝化 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ I* 基因的丰度。细菌 16S rRNA 基因丰度采用 TaqMan 探针法,氮相关功能基因丰度的测定采用嵌合荧光法检测法。PCR 扩增体系为 20 μL,内含 10.0 μL Premix Ex Taq II(分别为 PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, TAKARA, Japan 和 SYBR Green Supermix, BIO-RAD, USA), 0.5 μL 或 1.0 μL 前引物和后引物,1.5 μL 或 2.0 μL DNA 模板,用超纯水补足 (RNase-free)。定量 PCR 引物序列信息、PCR 扩增程序及标线制作见袁超磊等^[14]。定量 PCR 标线的扩增效率在 90%—100% 范围,标准曲线 $R^2 > 0.99$ 并通过凝胶电泳检验 PCR 产物。

1.6 数据分析

采用 SPSS 16.0 对数据进行单因子、多因子方差分析。采用 R 语言“vegan”,“Hmisc”,“corrplot”包等对硝化活性、氮功能基因丰度与土壤理化性质之间的关系进行冗余分析 (Redundancy Analysis, RDA) 和 Pearson 相关分析。冗余分析中膨胀因子大于 10 的环境因子没有呈现。采用 SigmaPlot 10.0 和 R 的“corrplot”包作图, $P < 0.05$ 差异检验显著。

2 结果与分析

2.1 玉米地和林地土壤氨氧化潜势和亚硝酸盐氧化潜势时空分布特征

图 1 为两种土地利用方式下土壤氨氧化潜势和亚硝酸盐氧化潜势在土壤剖面上的垂直变化。土壤氨氧

化潜势和亚硝酸盐氧化潜势均在 $0-1.0 \text{ mg NO}_2\text{-N (kg 干土)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 之间,且玉米地显著高于林地 ($P<0.05$) (图 1 和表 2)。两种土地利用方式下所有样品的氨氧化潜势和春季亚硝酸盐氧化潜势均随土壤深度增加而显著降低 ($P<0.05$),而秋季亚硝酸盐氧化潜势在不同土层间无显著差异。季节变化对氨氧化潜势和亚硝酸盐氧化潜势的影响不同 ($P>0.05$)。两种土地利用方式下土壤氨氧化潜势在不同季节间变化不显著 ($P>0.05$) (表 2),而土壤亚硝酸盐氧化潜势在秋季显著高于春季 ($P<0.05$)。多因子方差分析结果表明土地利用方式、季节变化和土壤深度对氨氧化潜势和亚硝酸盐氧化潜势的交互影响不显著(表 2)。

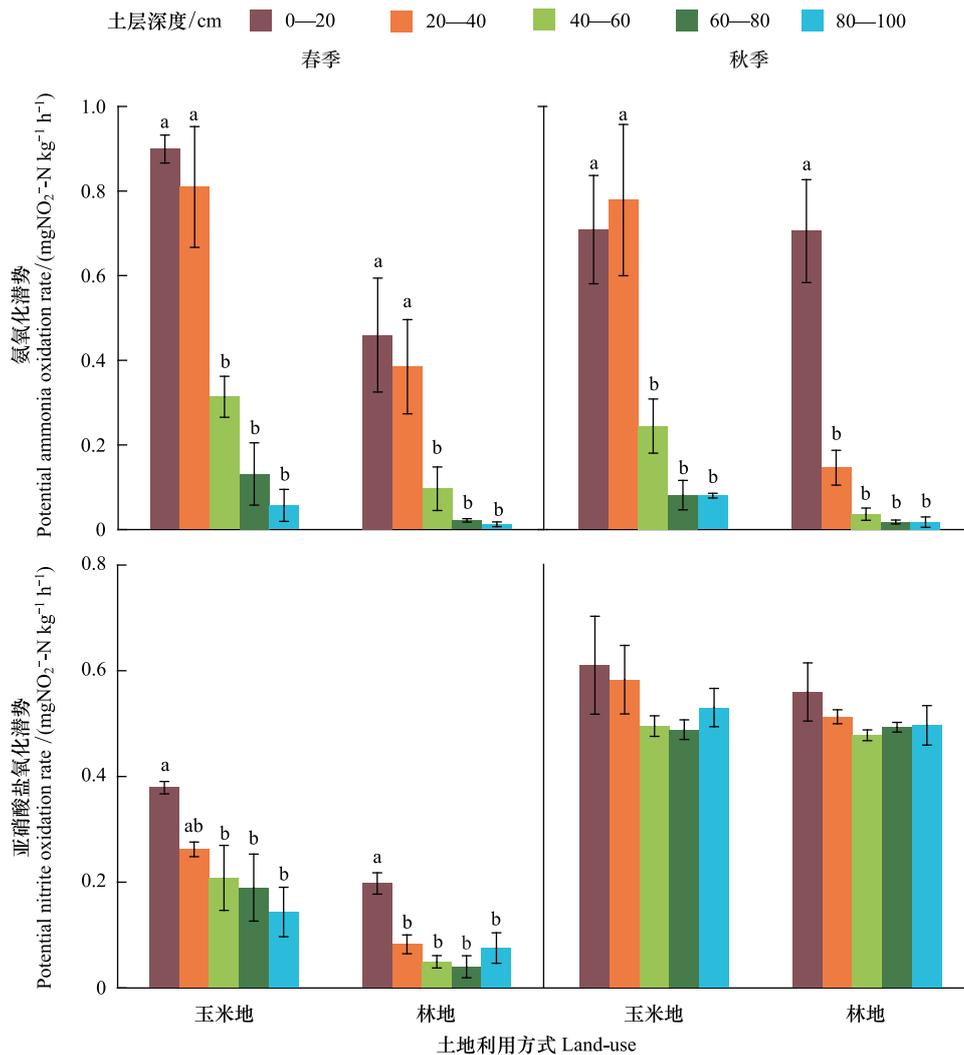


图 1 春、秋两季玉米地和林地不同土层的氨氧化潜势和亚硝酸盐氧化潜势

Fig.1 Potential ammonia oxidation and potential nitrite oxidation in two different land uses along the soil profile in spring and autumn

不同小写字母表示同一土地利用方式下不同土层间差异显著 ($P<0.05$)

2.2 玉米地和林地土壤细菌和氮循环功能基因丰度时空分布特征

图 2 为不同土地利用方式下细菌 16S rRNA 基因、氨氧化微生物 (AOA *amoA*、AOB *aomA*) 和反硝化微生物 (*nirS*、*nirK* 和 *nosZ I* 基因) 相关功能基因的垂直分布特征。土壤细菌和氮循环功能基因丰度均随土壤深度增加而显著降低 ($P<0.05$) (图 2、表 2)。玉米地沿土壤剖面各氮循环功能基因丰度范围 (拷贝数/g 干土) 分别为 AOA *amoA* 基因 $5.22 \times 10^7 - 3.30 \times 10^3$, AOB *amoA* 基因 $5.62 \times 10^7 - 1.0 \times 10^3$, *nirS* 基因 $4.32 \times 10^7 - 9.91 \times 10^2$, *nirK* 基因 $4.62 \times 10^7 - 2.97 \times 10^4$ 和 *nosZ I* 基因 $6.25 \times 10^7 - 2.70 \times 10^3$ 。林地土壤沿剖面则分别为 AOA *amoA* 基因 $7.67 \times 10^7 - 1.39 \times 10^3$, AOB *amoA* 基因 $5.52 \times 10^6 - 1.0 \times 10^3$, *nirS* 基因 $4.03 \times 10^6 - 1.02 \times 10^3$, *nirK* 基因 $5.49 \times 10^6 - 2.69 \times 10^4$

和 *nosZ I* 基因 $4.75 \times 10^6 - 3.29 \times 10^3$ 。整体上玉米地土壤氨氧化、反硝化微生物数量高于林地土壤。

单因子方差分析结果表明春季玉米地土壤 AOB *amoA*、*nirS*、*nirK* 和 *nosZ I* 基因丰度显著高于林地 ($P < 0.01$), 而秋季样品两种利用方式间无显著差异。玉米地 AOB *amoA* ($F = 6.905, P < 0.05$)、*nirS* ($F = 9.791, P < 0.01$)、*nirK* ($F = 4.577, P < 0.05$) 和 *nosZ I* ($F = 4.857, P < 0.05$) 基因丰度在不同季节间差异显著, 且秋季氨氧化、反硝化微生物的丰度呈下降趋势, 而 AOA *amoA* 基因 ($F = 3.017, P > 0.05$) 在不同季节间无显著差异。另外, 季节变化对林地土壤氮循环功能基因没有显著影响 ($P > 0.05$)。多因子方差分析表明土地利用方式、季节变化和土壤深度对细菌丰度和氮循环功能基因有显著影响, 但各变量间的交互作用均不显著 (表 2)。

表 2 三因子 PerMANOVA 分析土地利用方式、季节变化、土壤深度及其交互作用对氨、亚硝酸盐氧化潜势和氮循环基因的影响

Table 2 Statistical P values of three-way PerMANOVA results of land-use types, seasonal change, soil depth and their combination on PAO, PNO and N cycling related genes

	氨氧化潜势 PAO	亚硝酸盐 氧化潜势 PNO	细菌 16S rRNA 基因 Bacterial 16S rRNA gene	氨氧化古菌 <i>amoA</i> 基因 AOA <i>amoA</i> gene	氨氧化细菌 <i>aomA</i> 基因 AOB <i>amoA</i> gene	反硝化 <i>nirS</i> 基因 Denitrifier <i>nirS</i> gene	反硝化 <i>nirK</i> 基因 Denitrifier <i>nirK</i> gene	反硝化 <i>nosZ</i> 基因 Denitrifier <i>nosZ</i> gene
土地利用方式 Land-use type	<0.001	<0.001	0.003	0.02	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
季节变化 Seasonal change	0.32	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.004	<0.001
土壤深度 Soil depth	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
交互作用 Interaction	0.10	0.84	0.79	0.52	0.88	0.27	0.85	0.48

PAO: 氨氧化潜势 Potential ammonia oxidation; PNO: 亚硝酸盐氧化潜势 Potential nitrite oxidation; AOA: 氨氧化古菌 Ammonia oxidizing archaea; AOB: 氨氧化细菌 Ammonia oxidizing bacteria

2.3 土壤理化因子与氮功能微生物基因丰度和功能的相关性

图 3 为氨氧化、反硝化微生物丰度与土壤理化性质之间的冗余分析结果。土壤理化性质分别解释了玉米地和林地氮循环微生物差异的 48.7% 和 72.7%。玉米地的第 1 和第 2 排序轴解释量分别为 44.2% 和 3.5%, 而林地的第 1 和第 2 排序轴的解释量分别为 69.9% 和 1.7%。如图 3 所示, 玉米地和林地土壤可溶性有机碳、可溶性有机氮、铵态氮、硝态氮与氨氧化、反硝化微生物丰度正相关, 而土壤 C/N 比和 pH 与氨氧化、反硝化功能基因丰度显著负相关。

Pearson 相关性分析 (图 4) 表明土壤有机质、总氮、可溶性有机碳和可溶性有机氮含量与氨氧化、反硝化基因丰度、氨氧化潜势和亚硝酸盐氧化潜势显著正相关, 而土壤 C/N 比、pH 与氨氧化、反硝化基因丰度、氨氧化潜势和亚硝酸盐氧化潜势显著负相关。玉米地春季样品土壤铵态氮、硝态氮含量与氨氧化潜势显著正相关, 硝态氮含量还与 AOB *amoA*、*nirS* 和 *nirK* 基因丰度呈显著正相关关系。林地土壤春季样品铵态氮、硝态氮含量与氨氧化、反硝化基因丰度相关性却不显著。另外, 玉米地秋季样品铵态氮含量与 AOB *amoA*、*nirS* 基因拷贝数呈显著正相关, 而硝态氮含量与各功能基因丰度相关性均不显著; 而林地土壤硝态氮含量与氮循环功能基因丰度呈显著正相关, 相关系数大于 0.5。

3 讨论

土地利用方式的改变会引起土壤理化性质的变化, 从而影响土壤微生物资源可利用性, 最终改变土壤微生物包括病毒、细菌、古菌和真菌群落多样性和结构^[4, 15-16]。本研究结果表明玉米地土壤养分含量、细菌和氮循环相关微生物的丰度显著高于次生林土壤, 这与前人的研究结果不一致。有研究发现天然林地转变为人工林、耕地等方式后, 土壤剖面有机碳储量降低^[17], 而退耕还林, 由于减少人为干扰后土壤有机碳含量增

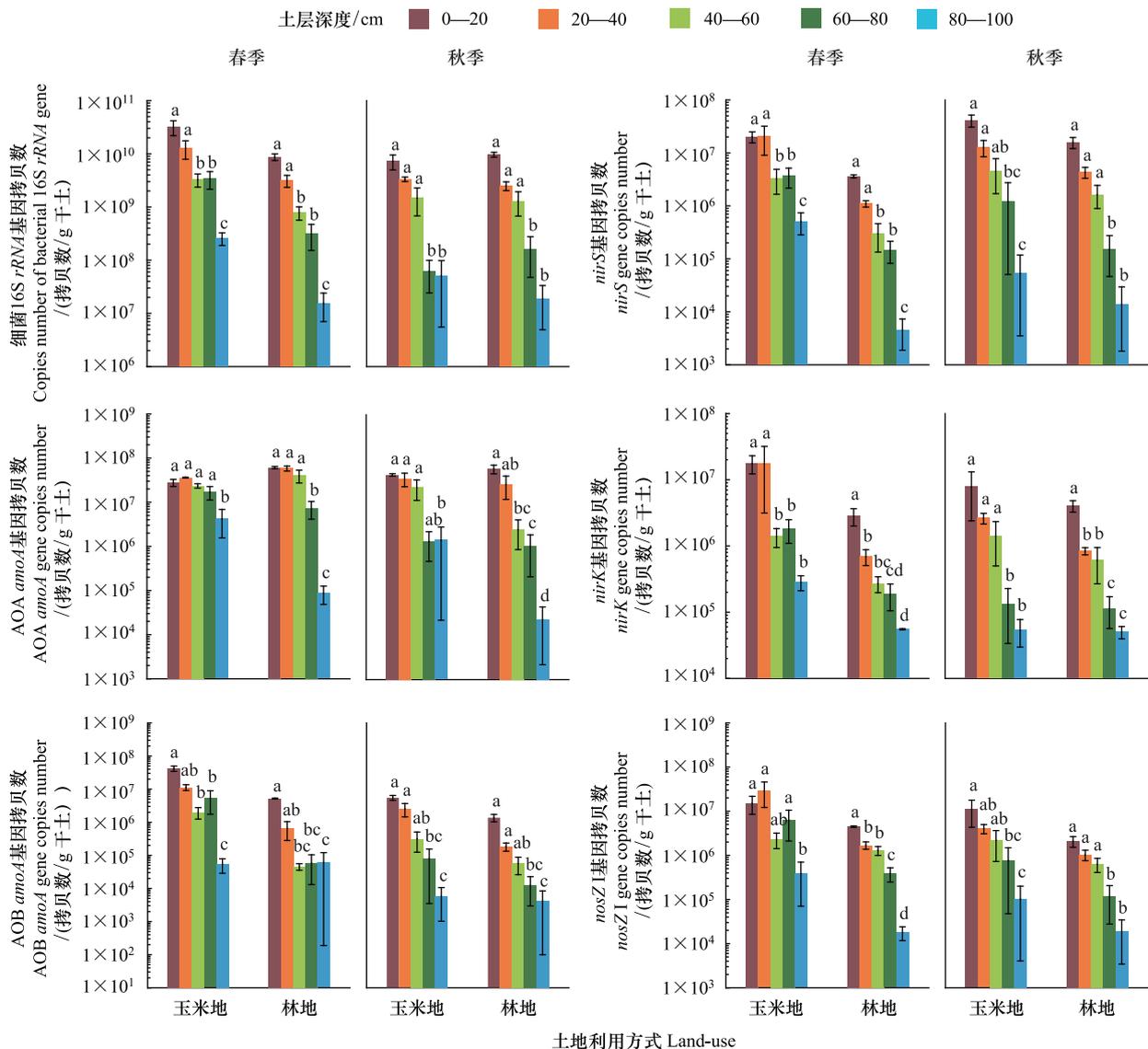


图2 玉米地和林地土壤细菌 16S rRNA 基因和氮循环功能基因丰度时空分布

Fig.2 Distribution of bacterial 16S rRNA gene and N cycling gene abundance in two different land uses along the soil profile in spring and autumn

不同小写字母表示同一土地利用方式下不同土层间差异显著 ($P < 0.05$)

加^[18]。Templer 等^[3]发现原始林地、农田及再生林土壤的氮转化过程存在差异,即使再生林土壤的理化性质已与原始森林土壤接近,但其土壤微生物量氮、土壤呼吸速率、矿化和硝化速率均低于原始林地。引起结果差异的主要原因是农田土壤受外源物质输入的影响。本文中玉米地的养分含量显著高于次生林地主要长期受牛粪的影响,而林地土壤除大气氮沉降外,无外源物质的输入。牛粪等畜禽粪便作为一种良好的有机肥,含有丰富的易降解的有机碳、氮、磷和其它微量元素,如果管理和使用得当,极利于改善土壤肥力和健康,提高土壤微生物生物量^[19]。以往长期施肥试验研究结果表明,有机粪肥的施用可改善土壤养分条件,促进土壤微生物和氮循环微生物的生长,进而影响土壤氮转化过程^[20-21]。

氨氧化作用是氮循环过程的关键环节,即在氨氧化微生物作用下将 NH_3 转化为 NO_2^- , 最终转化为 NO_3^- 。本研究通过实时荧光定量 PCR 技术分析了典型农田和次生林地土壤剖面上氨氧化微生物的丰度,发现不同土地利用方式可改变土壤氨氧化微生物丰度及其在垂直方向上的数量分布。除春季玉米地 0—20 cm 土层的

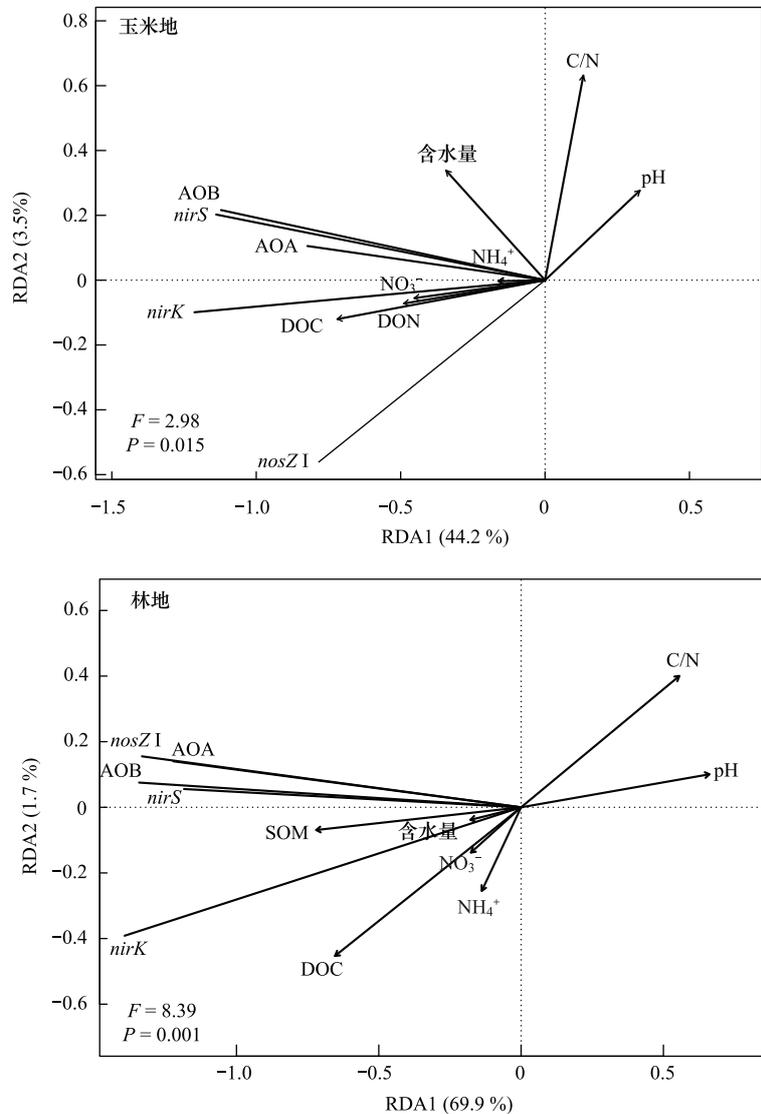


图3 玉米地和林地氨氧化、反硝化基因丰度和土壤理化性质的冗余分析(RDA)

Fig.3 Redundancy analysis between N cycling gene abundances and soil chemical properties in maize field and woodland

RDA:冗余分析 Redundancy analysis; SOM:土壤有机质 Soil organic matter; DOC:溶解性有机碳 Dissolved organic carbon; DON:溶解性有机氮 Dissolved organic nitrogen

AOA 数量略低于 AOB 外,玉米地和林地土壤的 AOA 数量均显著高于 AOB,表明 AOA 在潮土硝化过程中潜在的重要性。同时,不同土地利用方式间的 AOB 数量差异显著,表明土地利用方式可显著影响 AOB,这与前人的研究结果一致^[22-24]。土地管理方式可显著改变土壤氨氧化微生物数量和群落结构^[4]。垂直方向上, AOA 和 AOB 数量均随土壤深度增加而显著降低。但是与 AOB 相比, AOA 对土壤深度变化的响应较弱。基因组分析和大量的实验结果表明, AOA 和 AOB 存在生态位分化的特征^[25-26]。AOA 对底物的亲和力更高^[25],对氧气不敏感^[27]。因此,养分相对贫瘠的次表层土壤中, AOA 比 AOB 更有生存优势^[28-30]。

通常认为氨氧化过程是硝化过程的限速步骤,然而在土壤环境受到干扰时亚硝酸盐氧化过程也可成为硝化过程的限速步骤^[31]。本研究测定了两种土地利用方式下土壤氨氧化潜势和亚硝酸盐氧化潜势,发现玉米地土壤氨氧化潜势和亚硝酸盐氧化潜势显著高于林地土壤,这与土壤氨氧化微生物丰度变化趋势一致。相关性分析结果表明 AOA *amoA*、AOB *amoA* 基因丰度与氨氧化、亚硝酸盐氧化潜势之间存在显著相关性(图 4)。蔡祖聪和赵维^[32]观测了不同土地利用方式对湿润亚热带地区土壤硝化作用的影响,发现农用地的硝化潜势

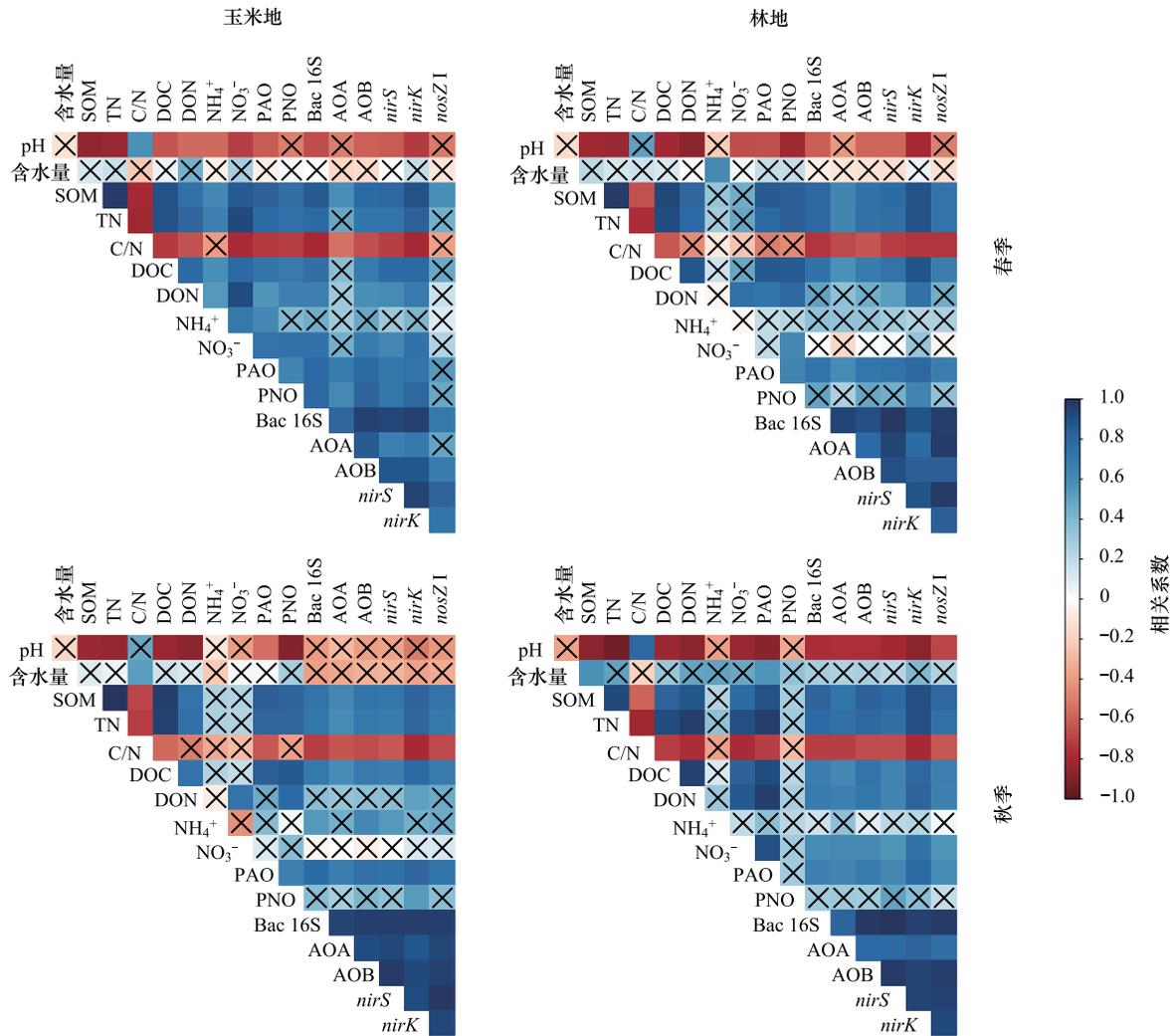


图 4 春、秋两季玉米地和林地土壤理化性质与微生物丰度相关性分析

Fig.4 Correlation analysis between soil physiochemical properties and microbial abundances across maize field and woodland in spring and autumn

×号表示相关性不显著($P>0.05$); TN:总氮 Total nitrogen; PAO:氨氧化潜势 Potential ammonia oxidation; PNO:亚硝酸盐氧化潜势 Potential nitrite oxidation; Bac 16S:细菌 16S rRNA 基因 Bacterial 16S rRNA gene

高于自然土壤(森林和灌丛)。也有研究结果表明有机肥施用可显著提高土壤氨氧化潜势和亚硝酸盐氧化潜势^[22, 33-34]。因此,不同施肥管理方式可引起氨氧化微生物发生变化,进而影响土壤氨氧化、亚硝酸盐氧化过程。

玉米地和林地春季样品 0—20、20—40 cm 土层的铵态氮和亚硝酸盐氧化潜势均显著高于其他土层,而秋季同样地样的铵态氮和亚硝酸盐氧化潜势沿土壤剖面呈现出不同的变化趋势。推测这种差异是由于氨氧化微生物和硝化微生物对季节变化的响应不同而引起。有研究表明 AOA 和 AOB 对氨氧化过程的贡献与温度有关, AOA 的最适平均温度比 AOB 高 10 °C^[35-37]。自然环境中氨氧化微生物与亚硝酸氧化微生物密切相关,以确保将潜在的具有细胞毒性的 NO₂ 迅速氧化为 NO₃^[38]。然而越来越多的研究发现氨氧化微生物和亚硝酸氧化微生物之间存在生态位差异,二者对环境扰动有不一致的响应^[38-40]。有研究证实了温度的差异可引起氨氧化过程和亚硝酸盐氧化过程的分离,氨氧化活性的最佳温度比亚硝酸盐氧化过程高了 8 °C^[41]。因此,不同氮功能微生物对环境变化响应的差异是影响氮循环过程的主要原因之一。

硝化过程为反硝化过程提供底物,因此,硝化和反硝化过程通常耦合发生,共同作用并构成土壤氮素损失的主要途径^[3]。本文发现两种土地利用模式下土壤硝化与反硝化微生物数量间均存在显著的正相关关系。前人用 Meta 分析结果也表明硝化、反硝化微生物紧密相关,且其丰度分别与硝化、反硝化速率之间存在显著的相关性^[42],说明硝化、反硝化微生物的数量可间接反映硝化、反硝化速率。本研究中,玉米地土壤反硝化 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ I* 基因的拷贝数均显著高于林地土壤。玉米地春季土壤各剖面层的 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ I* 基因丰度比对应的林地剖面土壤高 1—2 个数量级。在土壤剖面上,*nirS*、*nirK* 和 *nosZ I* 基因丰度均随土壤深度增加而显著下降。除林地秋季样品外,各土层的 *nirS* 基因丰度均高于 *nirK* 基因,表明 *nirS* 型亚硝酸盐还原微生物在亚硝酸盐还原过程中起主导作用。此结果与 Yuan 等^[43]报道的水稻土中 *nirS* 型反硝化微生物较 *nirK* 型具有更高的反应活性的结果较一致。一般认为潮土的砂粒含量较高,土壤有机碳含量较其它土壤类型低,通气性好,不利于反硝化过程的发生。但是在深层土壤中,由于硝酸盐的淋溶,底物充足,土壤氧含量低等因素,有利于反硝化过程的进行^[42, 44]。RDA 分析结果也表明土壤理化性质和反硝化基因存在明显的关系,土壤有机质含量、溶解性有机碳、氮含量、铵态氮和硝态氮含量可解释多数的变化丰富的反硝化功能基因。由于反硝化过程是一个耗能过程,微生物需要消耗碳源,因此土壤高有机碳含量可促进反硝化微生物的生长^[45]。反硝化功能基因(*nirS+nirK*)/*nosZ I* 的丰度比值可反映反硝化过程 N_2O 的排放情况。本研究中,玉米地土壤的 (*nirS+nirK*)/*nosZ I* 比值在 80—100 cm 达到最大值(5.5), N_2O 排放潜势高,但由于 N_2O 向上迁移的过程中,可被表层反硝化微生物截留、转化为 N_2 。因此,推测深层土壤具有较高的反硝化潜力,可用于考虑筛选反硝化微生物的富集培养土壤,而如何平衡深层土壤反硝化微生物活性及硝酸盐淋溶则是今后地下水污染的重要课题之一^[46—47]。

4 结论

本文结果表明:不同土地利用方式下,土壤硝化和反硝化微生物在季节更替和土壤垂直方向上存在显著差异,而不同氮转化微生物对季节变化的相应则不同。玉米地春季农田土壤氨氧化、反硝化微生物丰度均显著高于林地,氨氧化潜势也均高于林地。土壤碳、氮含量,硝化、反硝化微生物丰度及亚硝酸盐氧化潜势随土壤深度增加而显著下降。可见,如何提高土壤保氮能力、防控硝态氮淋溶和 N_2O 排放仍是今后农田氮肥管理和生态环境保护的研究重点。

参考文献 (References):

- [1] Hu H W, Chen D L, He J Z. Microbial regulation of terrestrial nitrous oxide formation: understanding the biological pathways for prediction of emission rates. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39(5): 729-749.
- [2] 孙瑞, 孙本华, 高明霞, 杨学云, 张树兰. 长期不同土地利用方式下壤土土壤微生物特性的变化. *植物营养与肥料学报*, 2015, 21(3): 655-663.
- [3] Templer P H, Groffman P M, Flecker A S, Power A G. Land use change and soil nutrient transformations in the Los Haitises region of the Dominican Republic. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(2): 215-225.
- [4] Shen J P, Cao P, Hu H W, He J Z. Differential response of archaeal groups to land use change in an acidic red soil. *Science of the Total Environment*, 2013, 461-462: 742-749.
- [5] Liu X H, Guo C C, He S S, Zhu H Y, Li J Y, Yu Z Y, Qi Y, He J Q, Zhang J B, Muller C. Divergent gross nitrogen transformation paths in the topsoil and subsoil between abandoned and agricultural cultivation land in irrigated areas. *Science of the Total Environment*, 2020, 716: 137148.
- [6] Zulkarnaen N, 程谊, 张金波. 土地利用方式对红壤氮素矿化和硝化作用的影响. *土壤通报*, 2019, 50(5): 1210-1217.
- [7] Cannavo P, Richaume A, Lafolie F. Fate of nitrogen and carbon in the vadose zone; in situ and laboratory measurements of seasonal variations in aerobic respiratory and denitrifying activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(3): 463-478.
- [8] Peterson M E, Curtin D, Thomas S, Clough T J, Meenken E D. Denitrification in vadose zone material amended with dissolved organic matter from topsoil and subsoil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 61: 96-104.
- [9] Qin S P, Hu C S, Clough T J, Luo J F, Oenema O, Zhou S G. Irrigation of DOC-rich liquid promotes potential denitrification rate and decreases $N_2O/(N_2O+N_2)$ product ratio in a 0-2 m soil profile. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 106: 1-8.

- [10] Fierer N, Schimel J P, Holden P A. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(1): 167-176.
- [11] 张皓, 冯利平. 近 50 年华北地区降水量时空变化特征研究. *自然资源学报*, 2010, 25(2): 270-279.
- [12] 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.
- [13] Attard E, Poly F, Commeaux C, Laurent F, Terada A, Smets B F, Recous S, Le Roux, X. Shifts between *Nitrospira*- and *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(2): 315-326.
- [14] 袁超磊, 贺纪正, 沈菊培, 戴宇, 张丽梅. 一个红壤剖面微生物群落的焦磷酸测序法研究. *土壤学报*, 2013, 50(1): 138-149.
- [15] Cai Y J, Shen J P, Di H J, Zhang L M, Zhang C J, He J Z. Variation of soil nitrate and bacterial diversity along soil profiles in manure disposal maize field and adjacent woodland. *Journal of Soils and Sediments*, 2020, 20(10): 3557-3568.
- [16] 毕丽, 杜帅, 于丹婷, 张丽梅, 贺纪正, 韩丽丽. 新疆两种土地利用方式下土壤病毒的群落组成与功能特征. *生态学报*, 2021, 41(7): 2728-2737.
- [17] 盛浩, 周萍, 李洁, 宋迪思, 张杨珠. 中亚热带山区深层土壤有机碳库对土地利用变化的响应. *生态学报*, 2014, 34(23): 7004-7012.
- [18] 任荣秀, 杜章留, 孙义亨, 宋学姝, 陆森. 华北低丘山地不同土地利用方式下土壤团聚体及其有机碳分布特征. *生态学报*, 2020, 40(19): 6991-6999.
- [19] Kallenbach C, Grandy A S. Controls over soil microbial biomass responses to carbon amendments in agricultural systems: a meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2011, 144(1): 241-252.
- [20] Hallin S, Jones C M, Schloter M, Philippot L. Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. *The ISME Journal*, 2009, 3(5): 597-605.
- [21] Luo G W, Li L, Friman V P, Guo J J, Guo S W, Shen Q R, Ling N. Organic amendments increase crop yields by improving microbe-mediated soil functioning of agroecosystems: a meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 124: 105-115.
- [22] Liu H F, Wu X, Wang Q, Wang S, Liu D, Liu G H. Responses of soil ammonia oxidation and ammonia-oxidizing communities to land-use conversion and fertilization in an acidic red soil of southern China. *European Journal of Soil Biology*, 2017, 80: 110-120.
- [23] Lu X D, Nicol G W, Neufeld J D. Differential responses of soil ammonia-oxidizing archaea and bacteria to temperature and depth under two different land uses. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 120: 272-282.
- [24] Tao J J, Bai T S, Xiao R, Wang P, Wang F W, Duryee A M, Wang Y, Zhang Y, Hu S J. Vertical distribution of ammonia-oxidizing microorganisms across a soil profile of the Chinese Loess Plateau and their responses to nitrogen inputs. *Science of the Total Environment*, 2018, 635: 240-248.
- [25] 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.
- [26] Prosser J I, Nicol G W. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends in Microbiology*, 2012, 20(11): 523-531.
- [27] French E, Kozłowski J A, Mukherjee M, Bullerjahn G, Bollmann A. Ecophysiological characterization of ammonia-oxidizing archaea and bacteria from freshwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(16): 5773-5780.
- [28] Di H J, Cameron K C, Shen J P, Winefield C S, O'Callaghan M, Bowatte S, He J Z. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72(3): 386-394.
- [29] 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(12): 3152-3152.
- [30] 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.
- [31] Han S, Zeng L Y, Luo X S, Xiong X, Wen S L, Wang B R, Chen W L, Huang Q Y. Shifts in *Nitrobacter*- and *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacterial communities under long-term fertilization practices. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 124: 118-125.
- [32] 蔡祖聪, 赵维. 土地利用方式对湿润亚热带土壤硝化作用的影响. *土壤学报*, 2009, 46(5): 795-801.
- [33] Wertz S, Leigh A K K, Grayston S J. Effects of long-term fertilization of forest soils on potential nitrification and on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 79(1): 142-154.
- [34] Rudisill M A, Turco R F, Hoagland L A. Fertility practices and rhizosphere effects alter ammonia oxidizer community structure and potential nitrification activity in pepper production soils. *Applied Soil Ecology*, 2016, 99: 70-77.

- [35] Aigle A, Gubry-Rangin C, Thion C, Estera-Molina K Y, Richmond H, Pett-Ridge J, Firestone M K, Nicol G W, Prosser J I. Experimental testing of hypotheses for temperature- and pH-based niche specialization of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(9): 4032-4045.
- [36] Ouyang Y, Norton J M, Stark J M. Ammonium availability and temperature control contributions of ammonia oxidizing bacteria and archaea to nitrification in an agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 113: 161-172.
- [37] Taylor A E, Giguere A T, Zobelein C M, Myrold D D, Bottomley P J. Modeling of soil nitrification responses to temperature reveals thermodynamic differences between ammonia-oxidizing activity of archaea and bacteria. *The ISME Journal*, 2017, 11(4): 896-908.
- [38] 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.
- [39] Hou L, Xie X B, Wan X H, Kao S J, Jiao N Z, Zhang Y. Niche differentiation of ammonia and nitrite oxidizers along a salinity gradient from the Pearl River estuary to the South China Sea. *Biogeosciences*, 2018, 15(16): 5169-5187.
- [40] 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.
- [41] Duan P P, Zhang Q Q, Xiong Z Q. Temperature decouples ammonia and nitrite oxidation in greenhouse vegetable soils. *Science of the Total Environment*, 2020, 733: 139391.
- [42] Ouyang Y, Evans S E, Friesen M L, Tiemann L K. Effect of nitrogen fertilization on the abundance of nitrogen cycling genes in agricultural soils: a meta-analysis of field studies. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 127: 71-78.
- [43] Yuan Q, Liu P F, Lu Y H. Differential responses of *nirK*- and *nirS*-carrying bacteria to denitrifying conditions in the anoxic rice field soil. *Environmental Microbiology Reports*, 2012, 4(1): 113-122.
- [44] Levy-Booth D J, Prescott C E, Grayston S J. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 75: 11-25.
- [45] Garcia-Montiel D C, Melillo J M, Steudler P A, Cerri C C, Piccolo M C. Carbon limitations to nitrous oxide emissions in a humid tropical forest of the Brazilian Amazon. *Biology and Fertility of Soils*, 2003, 38(5): 267-272.
- [46] Barrett M, Khalil M I, Jahangir M M R, Lee C, Cardenas L M, Collins G, Richards K G, O'Flaherty V. Carbon amendment and soil depth affect the distribution and abundance of denitrifiers in agricultural soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(8): 7899-7910.
- [47] Gai X P, Liu H B, Liu J, Zhai L M, Wang H Y, Yang B, Ren T Z, Wu S X, Lei Q L. Contrasting impacts of long-term application of manure and crop straw on residual nitrate-N along the soil profile in the North China Plain. *Science of the Total Environment*, 2019, 650: 2251-2259.