

DOI: 10.20103/j.stxb.202402010289

元晓春, 曾泉鑫, 周茜, 任梦潇, 李文周, 陈亚婷, 林开森, 陈岳民. 氮添加对亚热带毛竹林土壤硝化潜势和氨氧化微生物的影响季节差异. 生态学报, 2024, 44(23): 10734-10744.

Yuan X C, Zeng Q X, Zhou Q, Ren M X, Li W Z, Chen Y T, Lin K M, Chen Y M. Differential seasonal effects of nitrogen addition on nitrification potential and ammonia-oxidizing microorganisms in soil of subtropical moso bamboo forest. Acta Ecologica Sinica, 2024, 44(23): 10734-10744.

## 氮添加对亚热带毛竹林土壤硝化潜势和氨氧化微生物的影响季节差异

元晓春<sup>1,2</sup>, 曾泉鑫<sup>2,\*</sup>, 周茜<sup>1</sup>, 任梦潇<sup>2</sup>, 李文周<sup>3</sup>, 陈亚婷<sup>3</sup>, 林开森<sup>1</sup>, 陈岳民<sup>2,3</sup>

1 武夷学院旅游学院, 武夷山 354300

2 福建师范大学地理科学学院, 福州 350007

3 福建戴云山国家级自然保护区管理局, 德化 362500

**摘要:** 氨氧化是硝化作用的限速步骤, 也是评估氮沉降如何影响土壤氮循环过程的重要指标。氮添加 5 年后, 在湿季(6 月)和干季(12 月)采集亚热带毛竹林土壤样本, 结合室内磷添加实验, 探究了不同季节氮添加对土壤硝化潜势和氨氧化微生物的影响及其机理。研究表明, 在两个季节中, 氮添加显著提高土壤铵态氮含量, 降低土壤磷有效性; 氮添加仅显著降低干季土壤 pH。相比于湿季, 氮添加对干季土壤硝化作用和氨氧化微生物的影响更大。高氮添加显著增加干季土壤硝化潜势、氨氧化古菌(AOA)基因丰度和多样性, 改变 AOA 的群落结构; 而氮添加仅显著改变湿季土壤氨氧化细菌(AOB)的群落结构。在两个季节中, 与仅添加磷的土壤相比, 氮和磷共同添加下土壤的 AOA、AOB 基因丰度和硝化潜势显著更高。上述结果表明, 磷添加改变了氮添加对氨氧化微生物活性和硝化潜势的影响。此外, 回归分析显示, 在没有添加磷时, 土壤硝化潜势与 AOA 基因丰度呈显著正相关关系; 在添加磷后, 土壤 AOA 和 AOB 基因丰度均与土壤硝化潜势存在显著的正相关关系。这说明氮添加下土壤磷有效性的降低在一定程度上抑制了 AOB 活性及其对硝化潜势的贡献。总之, 该研究结果为更好地理解气候变化下亚热带贫磷土壤硝化作用和氮循环过程提供了理论基础。

**关键词:** 毛竹; 氨氧化微生物; 硝化作用; 氮添加; 季节; 磷有效性

## Differential seasonal effects of nitrogen addition on nitrification potential and ammonia-oxidizing microorganisms in soil of subtropical moso bamboo forest

YUAN Xiaochun<sup>1,2</sup>, ZENG Quanxin<sup>2,\*</sup>, ZHOU Qian<sup>1</sup>, REN Mengxiao<sup>2</sup>, LI Wenzhou<sup>3</sup>, CHEN Yating<sup>3</sup>, LIN Kaimiao<sup>1</sup>, CHEN Yuehmin<sup>2,3</sup>

1 College of Tourism, Wuyi University, Wuyishan 354300, China

2 School of Geographical Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

3 Daiyun Mountain National Nature Reserve Administration Bureau, Dehua 362500, China

**Abstract:** Ammonia oxidation is the rate-limiting step of nitrification and an important indicator for assessing how nitrogen (N) deposition affects soil N cycling processes. After a five-year N addition experiment, we collected soil samples from a subtropical Moso bamboo forest during the wet season (June) and dry season (December). In conjunction with a phosphorus (P) addition experiment in vitro, we investigated the effects of N addition on soil nitrification potential and ammonia-oxidizing microorganisms in different seasons, along with their underlying mechanisms. The results showed that N addition significantly increased soil ammonium N content and decreased soil P availability in both seasons. Additionally, N

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(32201532, 32371846); 福建省自然科学基金项目(2020J01397, 2020J01142)

**收稿日期:** 2024-02-01; **网络出版日期:** 2024-09-05

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: quanxinzeng@163.com

addition significantly reduced soil pH only in the dry season. N addition had more pronounced effects on nitrification and ammonia-oxidizing microorganisms in the dry season compared to the wet season. High N addition significantly increased soil nitrification potential, abundance, and diversity of ammonia-oxidizing archaea (AOA), and altered the community structure of AOA in the dry season. In contrast, N addition only significantly altered the community structure of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in the wet season. In both seasons, the gene abundance of AOA and AOB, as well as nitrification potential, were significantly higher in soil with combined N and P additions compared to soil with P additions alone. The above results indicated that P addition altered the effects of N addition on ammonia-oxidizing microbial activity and nitrification potential. Moreover, the regression analyses revealed that the nitrification potential was significantly positively correlated with the abundance of AOA gene in the absence of P addition. However, the nitrification potential was significantly positively associated with the gene abundance of both AOA and AOB when P was added. It suggests that the decrease in soil P availability caused by N addition suppressed AOB activity and its role in nitrification potential to some extent. The study collectively provides a theoretical basis for a better understanding of nitrification and nitrogen cycling processes in P-poor subtropical soils under climate change.

**Key Words:** moso bamboo; ammonia-oxidizing microorganisms; nitrification; nitrogen addition; season; P availability

氮的可用性是大多数陆地生态系统初级生产力的限制因素<sup>[1]</sup>。在过去的一个世纪中,由于化石燃料的燃烧和化肥的施用,大气氮沉降量急剧增加<sup>[2]</sup>。近期研究发现在欧洲等地区的无机氮沉降在逐渐减少,但在东亚和巴西南部等地区的无机氮沉降却仍在增加<sup>[3-4]</sup>。在森林生态系统中,过量的氮输入可能导致土壤酸化<sup>[5]</sup>、加速硝化作用和反硝化作用并导致硝酸盐淋溶和温室气体排放(如 N<sub>2</sub>O)增加<sup>[6]</sup>。土壤硝化作用涉及两个步骤,即通过氨氧化将铵根离子转化为亚硝酸盐,然后进一步转化为硝酸盐<sup>[7]</sup>。因此,氨氧化被认为是土壤硝化作用的限速步骤<sup>[8]</sup>。氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)是氨氧化过程的主要参与者。因此,AOA 和 AOB 的功能基因(*amoA*)被广泛用于识别土壤硝化作用过程的标记基因。大量研究报导了氮输入对 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 基因的影响,但研究结果并不一致。例如,氮添加对土壤 AOA-*amoA* 的丰度有显著促进作用,但显著降低或不影响 AOB-*amoA* 的丰度<sup>[9-10]</sup>。相反,一项 meta 分析发现氮添加同时促进 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 基因丰度<sup>[8]</sup>。这些矛盾的结果还表明,氮添加下 AOA 和 AOB 在硝化过程中的相对重要性尚不清楚。在酸性土壤中,AOA 被认为是硝化过程的主要参与者<sup>[11]</sup>,因为 AOB 喜好中性或偏碱性的环境,而 AOA 更喜好酸性环境<sup>[12-13]</sup>。然而,最近在亚热带森林的研究发现,尽管 AOA-*amoA* 基因丰度显著高于 AOB-*amoA* 基因,但 AOB-*amoA* 丰度对氮和磷的输入响应更敏感<sup>[14]</sup>。因此,进一步明确氮添加下 AOA 和 AOB 多样性和群落方面的响应及其机制对于理解亚热带森林土壤氮转化和氮积累至关重要,但相关研究成果仍然有限。

磷对三磷酸腺苷和氨酶蛋白的合成至关重要<sup>[15]</sup>。在森林、草原和耕地土壤中均发现 AOA-*amoA* 丰度与土壤磷有效性存在显著正相关关系<sup>[16-18]</sup>,表明磷对土壤氨氧化微生物的丰度具有重要影响。在热带和亚热带森林中,由于土壤高度风化且富含铁、铝等氧化物,这导致大量磷被氧化物所固定,进而导致土壤磷有效性普遍较低<sup>[19-20]</sup>。越来越多的研究表明,氮沉降增强了热带森林和亚热带森林生态系统中的磷限制<sup>[21-23]</sup>。长期氮输入会增加土壤铵态氮含量,从而促进土壤硝化作用。相反,氮输入导致的磷缺乏可能抑制氨氧化微生物的活性,进而抑制土壤硝化过程<sup>[16]</sup>。此外,磷的添加可以通过加速氮矿化来促进硝化作用<sup>[24]</sup>。然而,野外氮添加下土壤磷有效性的变化如何影响土壤硝化作用仍不清楚,因为磷有效性对微生物和硝化过程的影响可能受氮添加下土壤 pH 和氮有效性等因素变化的干扰。

毛竹(*Phyllostachys heterocycla*)是世界上最重要的非木材林产品来源<sup>[25]</sup>,而且在固碳和水土保持等方面具有重要的生态功能<sup>[26]</sup>。前期研究发现,氮添加显著增加干季毛竹林土壤无机氮含量,但在湿季影响较小<sup>[27]</sup>,这可能导致氮添加对土壤氮的硝化过程存在较大差异。尽管氮添加对土壤硝化作用和氨氧化微生物

活性的相关研究较为广泛,氮添加对硝化作用及相关其微生物的影响是否存在季节差异仍不清楚。因此,本研究通过采集野外氮添加样地土壤,结合室内磷添加实验,旨在:(1)探究不同季节氮添加对硝化潜势和相关微生物特征(功能基因丰度、多样性和群落结构)的影响;(2)揭示在氮添加下,酸性土壤中 AOA 和 AOB 在调节土壤硝化过程中的主导地位;(3)阐明氮添加下土壤磷有效性变化对硝化作用的潜在影响。根据已有研究进展,本研究假设:(1)氮添加(尤其在干季)会增加土壤铵态氮含量,这会提高 AOA 和 AOB 的功能基因丰度和多样性,改变其群落结构,从而促进硝化潜势;(2)在酸性土壤中,AOA 而非 AOB 可能是影响土壤硝化潜势和硝化过程主要微生物,尤其是氮添加可能进一步导致土壤酸化;(3)野外氮添加降低了土壤磷有效性,这可能在一定程度上抑制了 AOA 和 AOB 的丰度,削弱氮添加对土壤硝化作用的积极作用(如增加铵态氮含量)。通过室内磷添加实验能有效证明这一观点,即室内磷添加对野外氮添加下土壤 AOA 和 AOB 的丰度和硝化潜势的促进作用较对照(无氮添加)土壤更强。研究结果将有助于氮沉降增加背景下亚热带森林土壤氮损失和温室气体排放增加的风险评估。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区概况

试验地点位于福建省泉州市德化县戴云山国家森林公园保护区(25°38′07″—25°43′40″N, 118°05′22″—118°20′15″E),属亚热带海洋性季风气候。研究地点年均气温和降水量分别为 20℃ 和 1800 mm,降水主要集中在 3—9 月<sup>[23]</sup>。试验地为纯毛竹林,几乎没有其他乔木、灌木,且林下植被稀少,土壤主要为老成土<sup>[27]</sup>。2019 年的气温和降水动态如图 1 所示。

### 1.2 试验设计与野外取样

2014 年 7 月,在研究区随机选取了 9 块 3 m×10 m 的样方,通过完全随机方式设置了 3 种不同水平的氮添加处理:对照(CK, 0 kg N hm<sup>-2</sup> a<sup>-1</sup>)、低氮(LN, 20 kg N hm<sup>-2</sup> a<sup>-1</sup>)和高氮(HN, 80 kg N hm<sup>-2</sup> a<sup>-1</sup>)。每个氮添加水平设置了 3 个重复,各样方间隔 2 m 以上作为缓冲带。于 3—9 月(除 2014 年从 8 月开始),每月将 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>(LN, 24.49 g; HN, 73.47 g)溶解于 20 L 去离子水中,用背式喷雾器均匀喷洒于各样区中,对照喷洒等量的去离子水。2019 年 7 月和 12 月,在去除表面凋落物后,通过 5 点采样法采集 0—15 cm 土壤样本混合均匀。在实验室中去除石砾、碎屑以及植物根系后,将土壤过 2 mm 筛后分为 4 部分,一部分立即提取 DNA,一部分自然风干后测定土壤性质,一部分用于培养实验,其余部分储存于 -80℃ 备用。

### 1.3 室内磷添加实验

为了控制变量和探究土壤磷有效性对硝化过程的影响,本研究增设了室内磷添加实验。取干重为 100 g 的过筛新鲜土壤(通过含水率换算)置于 500 mL 的培养瓶中,参照田间管理方式进行磷添加(20 μg P/g 干土; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)。共设置 18 个培养瓶(9 个野外样地×2 个季节)。将所有培养瓶转移到 25℃ 培养箱培养 15 d,培养过程中将含水率调节至田间饱和持水量的 60%。在培养结束后,测定土壤 AOA-amoA 和 AOB-amoA 基因丰度和土壤硝化潜势。

### 1.4 测定项目与方法

土壤含水率通过烘干法测定。pH 通过 pH 计(FE20 Mettler Toledo, 德国)测定(土水比 1:5)。用元素分析仪(Elementar Vario EL III; Elementar Analysensysteme GmbH, 德国)测定土壤总碳(TC)和总氮(TN)含量。用去离子水提取土壤可溶解有机碳(DOC),振荡离心后经过 0.45 μm 滤膜抽滤得到待测液,用总有机碳分析

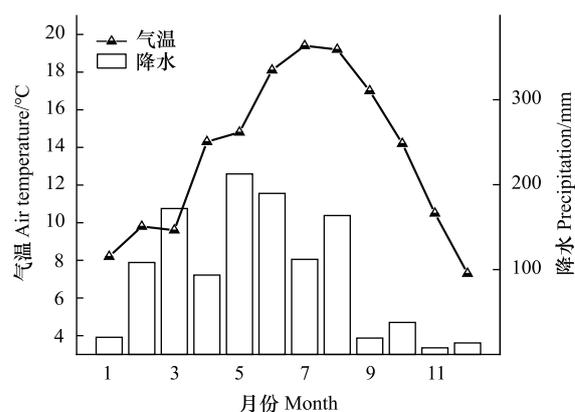


图 1 2019 年 1 月至 12 月本研究区气温和降水情况  
Fig. 1 Temperature and precipitation conditions in our study area from January to December in 2019

仪(TOC-VCPH/CPN,日本)测定 DOC 浓度。铵态氮( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )和硝态氮( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ )用 2 mol/L KCl 提取,用连续流动分析仪(Skalar san++,荷兰)测定<sup>[28]</sup>。土壤有效磷(AP)通过 0.5 mol/L  $\text{NaHCO}_3$  提取<sup>[29]</sup>,用连续流动分析仪测定。

土壤硝化潜势参照 Chu 等<sup>[30]</sup>测定。简而言之,称取 10 g 过筛鲜土于培养皿中,加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 调节土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量达到 400 mg/kg 干土,并将土壤含水率调节至最大田间持水量的 60%,以不添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的土壤作为对照组。将培养皿至于 25℃ 中避光培养 48 h。培养结束后,经过 1 mol/L KCl 提取,用连续流动分析仪测定滤液 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量。

通过 FastDNA Spin Kit (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, 美国)试剂盒提取土壤总 DNA,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测对 DNA 进行质量检测,质检合格的放入-80℃ 保存。使用 CFX96 定量 PCR 仪(Bio-Rad, CA, 美国)测定 AOA-*amoA*(引物对:Arch-*amoA*F 和 Arch-*amoA*R)和 AOB-*amoA*(引物对:*amoA*1F 和 *amoA*2R)基因的丰度,具体反映体系和环境设置参照文献<sup>[14]</sup>。使用 Illumina MiSeq PE300 平台(奥维森,中国北京)对 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 基因进行 PCR 扩增<sup>[31]</sup>。

## 1.5 数据处理

通过 SPSS 21.0 进行前处理和分析。通过单因素方差分析检验同一季节,不同氮添加处理下土壤理化性质的影响。通过双因素方差分析探究氮添加、季节变化及其交互作用对土壤硝化潜势、氨氧化微生物功能基因丰度和多样性的影响。同时,通过单因素方差分析 Duncan 法( $P<0.05$ )检验所有处理(3 氮添加 $\times$ 2 个季节)间指标的差异显著性。通过 R 4.1.0 Vegan 包,基于 Bray-Curtis 的主坐标分析法(PCoA)来评估不同处理下氨氧化微生物群落组成的差异。通过 Pearson 相关探究土壤理化性质、土壤硝化潜势和氨氧化微生物丰度间的相关关系。此外,以土壤理化性质为环境因子,以土壤硝化潜势和氨氧化微生物丰度为物种因子,利用 Canoco 5.0 软件进行冗余分析(RDA)。回归分析图和柱状图通过 Origin 9.1 软件绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 氮添加对土壤理化性质的影响

氮添加对湿季土壤 pH 无显著影响;但与对照相比,高氮处理显著降低干季土壤 pH ( $P<0.05$ ; 表 1)。氮添加显著降低湿季和干季土壤 DOC 和 AP 含量( $P<0.05$ ),并显著增加湿季和干季土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量( $P<0.05$ ),但对 TC、TN 和 TP 含量无显著影响(表 1)。总体上,湿季土壤含水率和 DOC 含量显著高于干季,但土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量显著低于干季( $P<0.05$ )。

表 1 氮添加对不同季节毛竹林土壤理化性质的影响

Table 1 Effect of nitrogen addition on soil physico-chemical properties in the bamboo forest in different seasons

土壤特性 Soil properties	湿季 Wet season			干季 Dry season		
	对照 CK	低氮 LN	高氮 HN	对照 CT	低氮 LN	高氮 HN
土壤含水率 SWC/%	84.6(4.02) a	77.3(5.72) a	83.3(6.01) a	39.7(4.35) b	37.6(3.77) b	38.9(1.33) b
酸碱值 pH	4.74(0.06) a	4.64(0.06) a	4.69(0.03) a	4.85(0.01) a	4.76(0.05) a	4.34(0.16) b
总碳 TC/(g/kg)	45.8(0.81) a	49.4(2.15) a	39.0(1.52) a	44.7(4.41) a	45.8(2.92) a	50.3(3.36) a
总氮 TN/(g/kg)	3.81(0.06) a	4.02(0.13) a	3.43(0.09) a	3.90(0.22) a	3.95(0.12) a	4.41(0.24) a
总磷 TP/(g/kg)	1.03(0.11) a	1.03(0.15) a	0.95(0.11) a	0.89(0.11) a	0.98(0.05) a	0.91(0.07) a
可溶性有机碳 DOC/(mg/kg)	188(22.7) a	143(12.2) b	113(4.39) d	152(1.01) b	136(4.54) c	70.9(7.89) e
铵态氮 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ /(mg/kg)	14.4(1.03) c	21.6(3.13) b	21.5(3.99) b	27.8(3.06) b	26.5(5.16) b	54.1(6.26) a
硝态氮 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ /(mg/kg)	3.75(0.04) d	4.86(0.31) c	4.99(0.24) c	6.46(0.17) b	6.09(0.73) b	10.5(1.61) a
有效磷 AP/(mg/kg)	6.77(0.52) a	4.71(0.06) b	5.21(0.44) b	6.80(0.40) a	5.03(0.12) b	5.47(0.21) b

SWC:土壤含水率 Soil water content; pH:酸碱值 pH value; TC:总碳>Total carbon; TN:总氮 total nitrogen; TP:总磷 Total phosphorus; DOC:可溶性有机碳 Dissolved organic carbon; AP:有效磷 Available phosphorus; CT:对照 Control; LN:低氮 Low nitrogen; HN:高氮 High nitrogen; 不同小写字母表示不同处理之间差异显著( $P<0.05$ )

## 2.2 氮和磷添加对土壤硝化潜势和氨氧化微生物基因丰度的影响

双因素方差分析结果表明,不添加磷时,氮添加和季节变化对土壤硝化潜势 ( $P<0.001$ ) 和 AOA-*amoA* 基因丰度有显著的交互作用 ( $P<0.05$ ; 图 2)。与对照相比,土壤硝化潜势和 AOA-*amoA* 基因丰度在干季高氮处理下显著增加 ( $P<0.05$ ),但不受在湿季氮添加处理的影响。在两个季节中,氮添加均不改变 AOB-*amoA* 基因丰度。然而,在添加磷后,氮添加和季节变化对土壤硝化潜势和 AOA-*amoA* 基因丰度的交互作用不显著,且氮添加显著提高 AOB-*amoA* 基因丰度 ( $P<0.001$ )。上述结果表明,磷添加显著改变了土壤硝化过程对氮添加

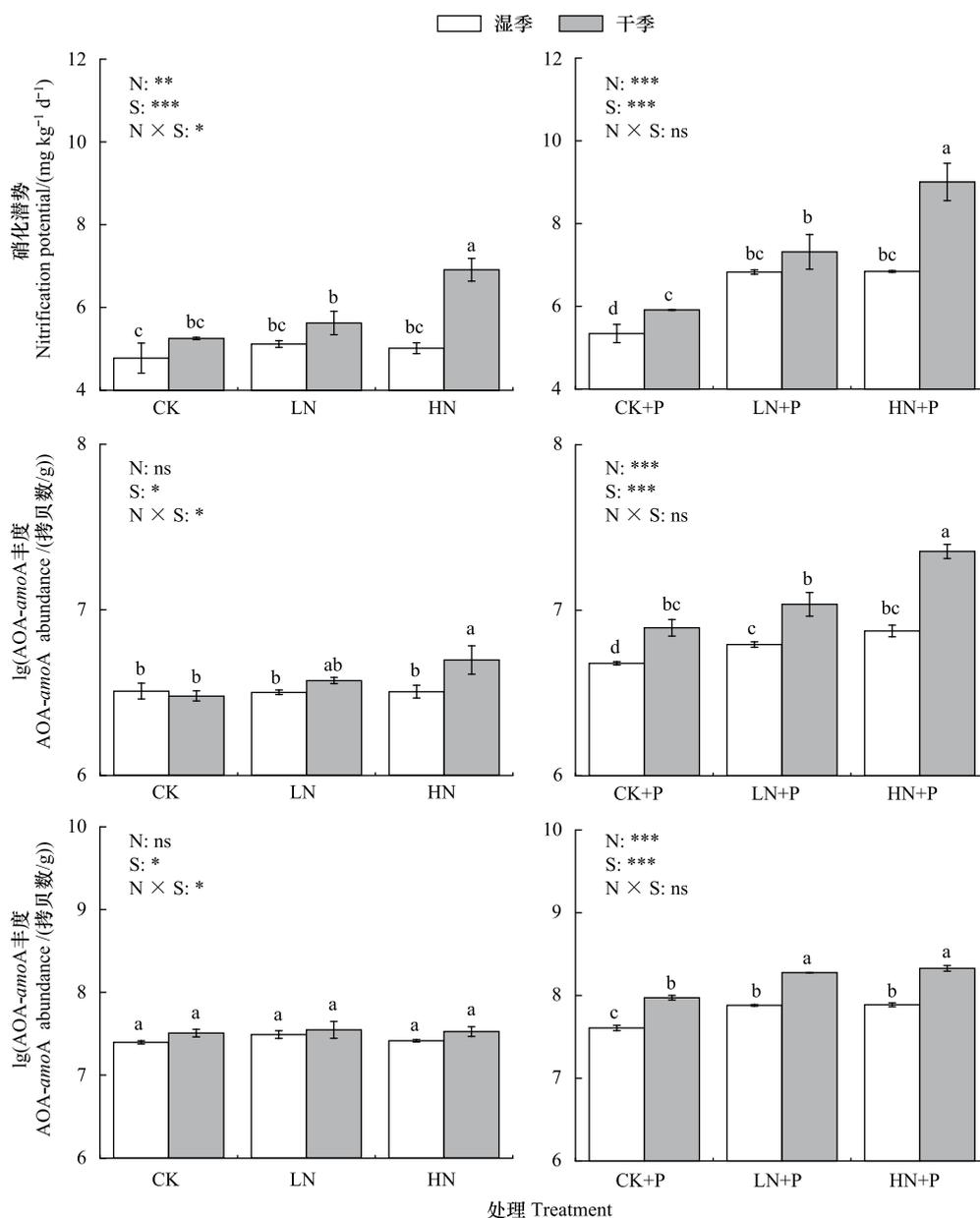


图 2 氮添加和磷添加对不同季节土壤硝化潜势和氨氧化微生物功能基因丰度的影响

Fig.2 Effect of nitrogen and phosphorus additions on the soil nitrification potential and functional genes abundance of ammonia oxidizers in the bamboo forest in different seasons

AOA: 氨氧化古菌 ammonia-oxidizing archaea; AOB: 氨氧化细菌 ammonia-oxidizing bacteria; CK: 对照 Control; LN: 低氮 Low nitrogen; HN: 高氮 High nitrogen; CK+P: 对照加磷 Control added with phosphorus; LN+P: 低氮加磷 Low nitrogen and phosphorus additions; HN+P: 高氮加磷 High nitrogen and phosphorus additions; N, S 和 N x S 分别代表氮添加和季节的主效应以及二者的交互作用; \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ; \*\*\*,  $P<0.001$ ; ns,  $P>0.05$ ; 不同小写字母代表相同季节下不同氮处理间存在显著差异

的响应。具体而言,在没有添加磷时,氮添加不改变湿季土壤硝化潜势,但导致干季土壤硝化潜势显著增加 7.05%—31.35%;在添加磷后,氮添加下湿季和干季土壤硝化潜势分别较对照显著增加 27.81%—28.10% 和 23.74%—52.32%。结果还显示,干季土壤硝化潜势、AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 基因丰度显著高于湿季。

### 2.3 氮添加对氨氧化微生物多样性和群落结构的影响

氮添加和季节变化对 AOA-*amoA* 多样性(物种数和 Shannon 指数)有显著的交互作用( $P < 0.05$ ; 图 3)。高氮添加显著提高干季 AOA-*amoA* 的物种数和 Shannon 指数( $P < 0.05$ );氮添加对 AOB-*amoA* 多样性无显著影响。总体上,干季土壤 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 多样性显著高于湿季( $P < 0.05$ , 图 3)。此外,主成分分析表明湿季和干季分别显著影响 AOB 和 AOA 群落结构(图 4)。具体而言,在干季,高氮处理下土壤 AOA 群落结果较对照和低氮处理存在显著差异( $P < 0.05$ );相反,在湿季,高氮处理下土壤 AOB 群落结构较对照和低氮处理存在显著差异( $P < 0.05$ , 图 4)。

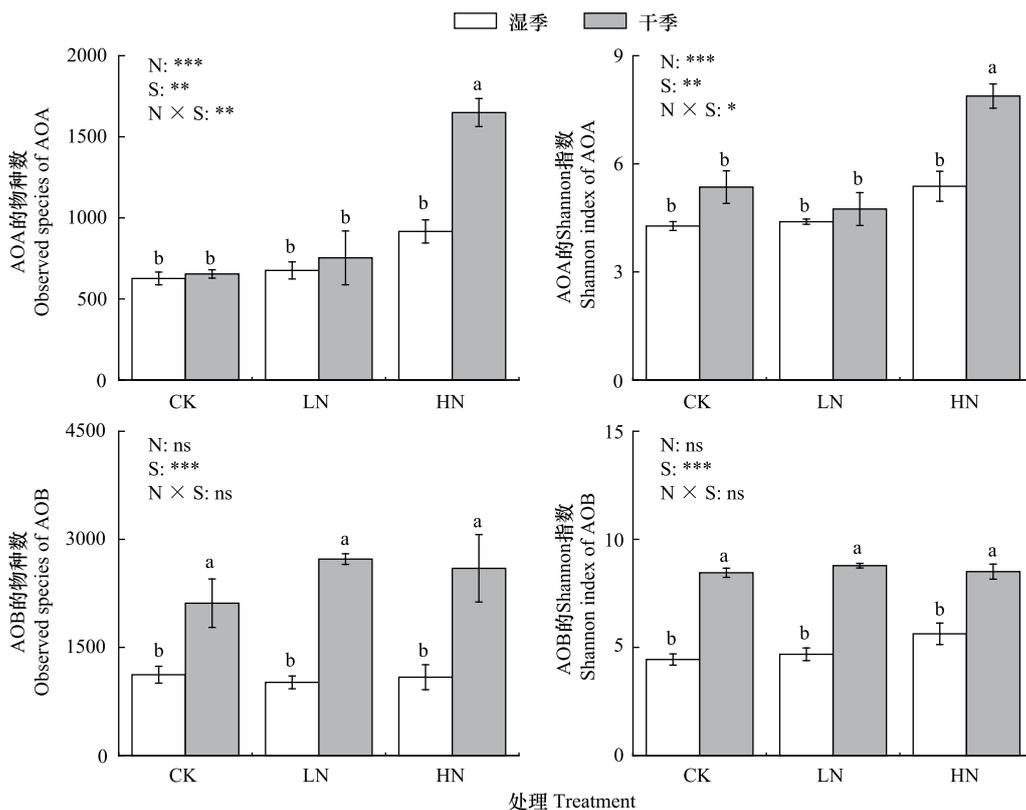


图 3 氮添加对不同季节毛竹林土壤氨氧化微生物多样性指数的影响

Fig.3 Effect of nitrogen addition on the diversity indices of soil ammonia oxidizers in the bamboo forest in different seasons

### 2.4 硝化潜势和氨氧化微生物特征与土壤理化性质的关系

在不同氮添加处理下,土壤硝化潜势的影响因素存在季节差异(表 2)。在湿季,土壤硝化潜势与土壤 DOC 含量存在显著负相关关系( $P < 0.05$ );在干季,土壤硝化潜势与  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  含量存在显著正相关关系( $P < 0.05$ ),与 pH、DOC 含量呈显著负相关关系( $P < 0.05$ )。在两个季节,土壤 pH 都与 AOA-*amoA* 基因丰度存在显著负相关关系( $P < 0.05$ )。在干季,AOA-*amoA* 基因丰度还与  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  含量存在显著正相关关系( $P < 0.05$ )。冗余分析显示,对照和氮添加处理在湿季没有较好的聚类,但在湿季存在明显聚类效果,表明氮添加显著改变干季土壤硝化潜势和氨氧化微生物的丰度(图 5)。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  含量解释了干季氮添加下,土壤硝化潜势和氨氧化微生物变异的 81.7%。

不添加磷时,土壤硝化潜势与 AOA-*amoA* 丰度存在显著正相关关系( $P < 0.05$ ; 图 6),但与 AOB-*amoA* 丰

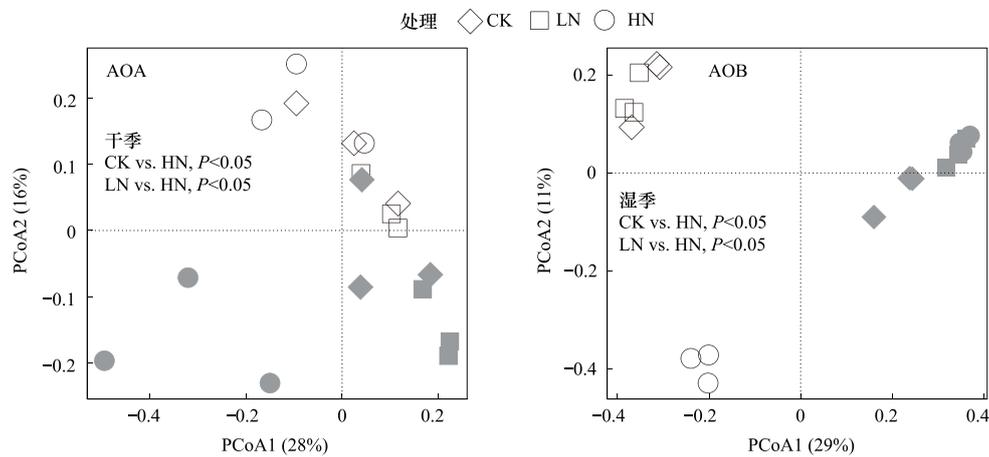


图 4 氮添加对湿季和干季毛竹林土壤氨氧化微生物群落结构的影响

Fig.4 Effects of nitrogen addition on the community composition of soil ammonia oxidizers in the bamboo forest in the wet and dry seasons

PCoA1: 主坐标 1 轴 Principal axis 1; PCoA2: 主坐标 2 轴 Principal axis 2

度无关;在添加磷后,不同氮添加处理下土壤硝化潜势与 AOA-amoA 和 AOA-amoA 丰度均呈显著正相关关系 ( $P < 0.05$ )。

表 2 土壤硝化潜势和氨氧化微生物功能基因丰度与土壤性质的相关分析

Table 2 Correlation analysis of soil properties with nitrification potential and characteristics of ammonia oxidizers

	湿季 Wet season			干季 Dry season		
	硝化潜势 Nitrification potential	氨氧化古菌 amoA 基因 AOA-amoA	氨氧化细菌 amoA 基因 AOB-amoA	硝化潜势 Nitrification potential	氨氧化古菌 amoA 基因 AOA-amoA	氨氧化细菌 amoA 基因 AOB-amoA
硝化潜势	1.00	0.65 *	0.54	1.00	0.72 *	-0.10
酸碱值 pH	-0.17	-0.71 *	-0.07	-0.89 **	-0.67 *	-0.13
总碳 TC	0.10	0.21	0.21	0.20	0.40	-0.25
总氮 TN	0.19	0.16	0.44	0.45	0.64	-0.09
总磷 TP	0.58	0.31	0.32	-0.16	-0.28	-0.39
可溶性有机碳 DOC	-0.68 *	-0.35	-0.41	-0.95 **	-0.61	0.13
铵态氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	0.25	-0.30	0.23	0.92 **	0.75 *	0.06
硝态氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	0.39	0.24	0.12	0.53	0.62	-0.08
有效磷 AP	-0.22	-0.11	-0.45	-0.40	-0.65	-0.25

\* :  $P < 0.05$ ; \*\* :  $P < 0.01$

### 3 讨论

#### 3.1 土壤硝化过程对氮添加响应存在季节差异

本研究发现,仅高氮添加显著增加干季土壤硝化潜势和 AOA-amoA 基因丰度及其多样性,这与先前研究结果一致<sup>[10,32]</sup>。这一发现可以解释为高氮添加大幅提高了干季土壤 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量(较对照增加 26.3 mg/kg)。低氮添加没有显著提高土壤 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量可能与氮添加促进了毛竹的生长有关,从而促进了毛竹对氮的吸收<sup>[27]</sup>。尤其是,最近的研究证实了毛竹偏好吸收铵态氮<sup>[33-34]</sup>。然而,本研究发现,湿季土壤硝化潜势和氨氧化微生物的丰度不受氮添加影响,尽管湿季氮添加导致土壤 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量显著增加 7.1—7.2 mg/kg。这一结果表明,氮添加可能同时诱发了一些不利于氨氧化微生物活性和硝化作用的因素。例如,先前研究发现本研究区土壤微生物的生长受到磷有效性限制<sup>[23]</sup>,而氮添加显著降低了土壤磷有效性,从而抵消了增加 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含

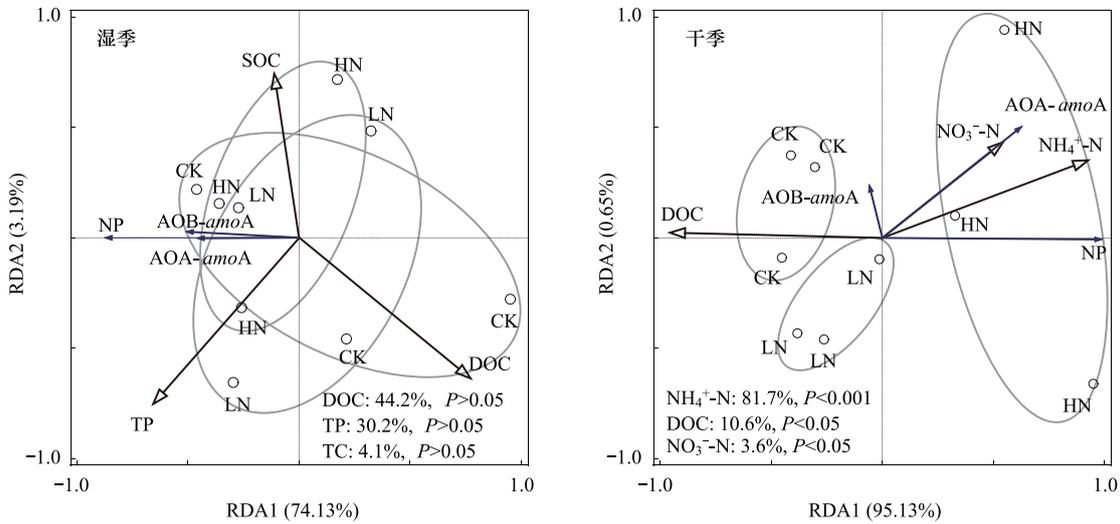


图 5 湿季和干季土壤硝化潜势和氨氧化微生物丰度的冗余分析

Fig.5 Redundancy analysis of nitrification potential and ammonia-oxidizing microorganisms abundance in the wet and dry seasons

DOC:可溶性有机碳 Dissolved organic carbon; TP:总磷 Total phosphorus; TC:总碳 Total carbon; NP:硝化潜势 Nitrification potential; RDA1:冗余分析 1 轴 Redundancy Analysis axis 1; RDA2:冗余分析 2 轴 Redundancy Analysis axis 2

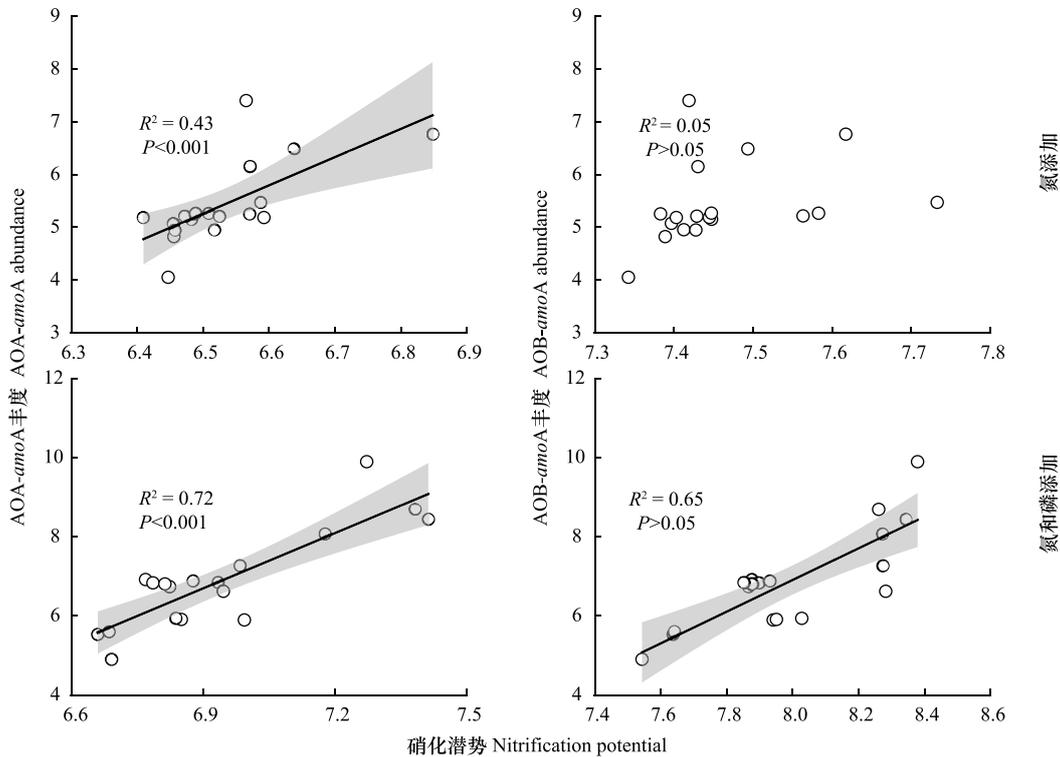


图 6 不同处理下氨氧化微生物功能基因丰度与土壤硝化潜势的关系

Fig.6 Relationships between functional genes abundance of soil ammonia oxidizers and nitrification potential under different treatments

图中阴影部分代表 95% 的置信区间

量对硝化潜势的积极作用。此外,上述结果表明土壤硝化过程对氮添加响应存在季节差异,这可以部分解释为湿季土壤  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  含量显著低于干季,且高氮处理对于干季土壤  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  含量的促进作用比湿季更强烈。高氮

处理下两个季节土壤含量的差异可能存在以下原因:一方面,植物和微生物在湿季比干季具有更高的活性和对氮素的需求<sup>[35]</sup>。另一方面,湿季更高的降水量和土壤含水率(图 1,表 1)会导致土壤氮的淋溶损失增加<sup>[14]</sup>。先前的研究也发现,高氮添加可能会促进亚热带森林土壤中的淋溶作用,尤其在湿季,从而加速生态系统氮循环<sup>[35]</sup>。因此,由于干季植物对氮的吸收和土壤淋溶作用较弱,大量的氮添加(HN 处理)导致干季土壤  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  大量积累,从而更有利于氨氧化微生物的活性和硝化作用。

作为好氧氨氧化的驱动者,土壤溶氧量的增加可能会提高 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 的丰度,促进氨氧化过程<sup>[36]</sup>。同时,温度也是影响氨氧化微生物分布模式的重要环境因素。例如,Lin 等<sup>[37]</sup>在不同温度的生物膜反应器中发现,AOA 和 AOB 的丰度随温度降低呈下降趋势。通过室内恒温培养,马瑞等<sup>[38]</sup>发现 4℃ 的环境中 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 的丰度和硝化作用均弱于 15℃ 和 28℃。湿季土壤温度高于干季,可能对氨氧化微生物和氨氧化作用有积极影响;但湿季较高的土壤含水量可能会导致土壤氧气相对供应不足,亦可能对氨氧化微生物和氨氧化作用有消极影响。此外,先前研究表明毛竹的土壤根系生物量在 7 月份达到最大值,在次年 2 月份达到最低值<sup>[39]</sup>,这可能导致湿季植物根系与氨氧化微生物对土壤有效氮素的竞争较干季更剧烈。因此,总体上土壤硝化潜势和氨氧化微生物丰度在季节间差异不显著(除了高氮处理)可能是因为毛竹的生长节律、土壤温度和水分等方面的综合作用。

### 3.2 土壤中 AOA 和 AOB 在调节土壤硝化过程的重要性

氮添加显著影响 AOA-*amoA* 而非 AOB-*amoA* 基因丰度和多样性,表明 AOA 比 AOB 对氮添加更为敏感(图 2,图 3)。这一结果与先前研究发现无机氮肥显著促进 AOA 的生长,但对 AOB 生长没有影响相似<sup>[40]</sup>。更重要的是,AOA 和土壤硝化潜势对氮添加的响应具有一致性,且 AOA-*amoA* 基因丰度对硝化潜势变化的解释度远高于 AOB-*amoA* 基因(图 6),表明 AOA 在调节土壤硝化过程中的主导地位。这个结果支持了先前研究的观点,即在酸性土壤中,AOA 比 AOB 更具有生存优势,且在硝化过程中发挥的作用更大<sup>[12,41-42]</sup>。 $\text{NH}_3$  的氧化是氨氧化微生物生长的主要能量来源。有研究认为,AOA 比 AOB 对  $\text{NH}_3$  具有好的亲和力<sup>[39]</sup>。因此,氮添加下土壤 pH 的降低不利于  $\text{NH}_4^+$  解离形成  $\text{NH}_3$ <sup>[40,43]</sup>( $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}^+$ ),相对更有利于 AOA 的生长<sup>[32,44]</sup>。此外,本研究中,AOA 的丰度和土壤硝化潜势均与 TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  存在显著负相关关系,与先前研究发现 AOA 的丰度与土壤 TN 和  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  含量呈正相关关系一致<sup>[45]</sup>。因此,氮添加通过改变土壤 pH 和氮有效性,影响了 AOA 的生长,从而促进硝化作用。

### 3.3 氮添加下土壤磷有效性降低对硝化作用存在消极作用

氮添加下土壤磷有效性的降低可能对土壤氨氧化微生物活性有消极影响。与预期结果不同,在没有添加磷时,不同氮添加下土壤 AP 含量与氨氧化微生物的丰度没有显著关联(表 2)。实际上,这一结果可能是因为氮添加下土壤  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  含量的增加主导了硝化过程(尤其是干季,图 5),即土壤氮有效性的对氨氧化微生物丰度的积极作用远大于土壤 AP 降低带来的消极影响。这部分推测得到室内磷添加实验的佐证。具体而言,与没有添加磷相比,在添加磷后,氮添加对氨氧化微生物丰度和硝化潜势的促进作用更强烈(图 3)。因此,氮添加下土壤磷有效性的降低可能在一定程度上抑制了硝化过程。此外,在没有添加磷时,不同氮添加处理下土壤 AOB-*amoA* 基因丰度与硝化潜势不存在显著关联;在磷添加下,二者存在显著正相关关系(图 6)。据此推测,氮添加下土壤磷有效性的降低在一定程度上抑制了 AOB 活性,导致 AOB-*amoA* 丰度与硝化潜势的变化脱钩。这个结果可以通过 AOA 和 AOB 的生态位差异解释。例如,以往研究认为,与 AOB 相比,AOA 更适合在寡营养条件下生长<sup>[14]</sup>。在本研究区的前期研究也发现,低磷有效性限制了土壤微生物细菌的生长和代谢过程<sup>[23]</sup>。因此,氮添加下土壤磷有效性的降低主要抑制了 AOB 的活性。

## 4 结论

氮添加对毛竹林土壤硝化潜势和氨氧化微生物特征(丰度、多样性和群落结构)的影响存在季节差异。在干季,高氮添加促进土壤铵态氮积累并降低土壤 pH,从而增加 AOA 活性和土壤硝化潜势。在酸性土壤中,

AOA 而非 AOB 是驱动土壤硝化过程的关键微生物。氮添加下土壤磷有效性的降低在一定程度上抑制了氨氧化微生物(尤其是 AOB)的活性,削弱了铵态氮增加对硝化过程的促进作用。因此,在森林经营管理过程中需适当使用磷肥以避免土壤氮损失增加。

#### 参考文献(References):

- [ 1 ] LeBauer D S, Treseder K K. Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology*, 2008, 89(2): 371-379.
- [ 2 ] Galloway J N, Townsend A R, Erisman J W, Bekunda M, Cai Z C, Freney J R, Martinelli L A, Seitzinger S P, Sutton M A. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 2008, 320(5878): 889-892.
- [ 3 ] Ackerman D, Millet D B, Chen X. Global estimates of inorganic nitrogen deposition across four decades. *Global Biogeochemical Cycles*, 2019, 33(1): 100-107.
- [ 4 ] Yu G R, Jia Y L, He N P, Zhu J X, Chen Z, Wang Q F, Piao S L, Liu X J, He H L, Guo X B, Wen Z, Li P, Ding G A, Goulding K. Stabilization of atmospheric nitrogen deposition in China over the past decade. *Nature Geoscience*, 2019, 12: 424-429.
- [ 5 ] Lu X K, Mao Q G, Gilliam F S, Luo Y Q, Mo J M. Nitrogen deposition contributes to soil acidification in tropical ecosystems. *Global Change Biology*, 2014, 20(12): 3790-3801.
- [ 6 ] Dise N B, Rothwell J J, Gauci V, van der Salm C, de Vries W. Predicting dissolved inorganic nitrogen leaching in European forests using two independent databases. *The Science of the Total Environment*, 2009, 407(5): 1798-1808.
- [ 7 ] Prosser J I. Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 1989, 30: 125-181.
- [ 8 ] Carey C J, Dove N C, Beman J M, Hart S C, Aronson E L. Meta-analysis reveals ammonia-oxidizing bacteria respond more strongly to nitrogen addition than ammonia-oxidizing Archaea. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 99: 158-166.
- [ 9 ] Shi X Z, Hu H W, Wang J Q, He J Z, Zheng C Y, Wan X H, Huang Z Q. Niche separation of comammox *Nitrospira* and canonical ammonia oxidizers in an acidic subtropical forest soil under long-term nitrogen deposition. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 126: 114-122.
- [ 10 ] Pereg L, Morugán-Coronado A, McMillan M, García-Orenes F. Restoration of nitrogen cycling community in grapevine soil by a decade of organic fertilization. *Soil and Tillage Research*, 2018, 179: 11-19.
- [ 11 ] 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.
- [ 12 ] 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.
- [ 13 ] 肖红, 刘玉玲, 刘忠宽, 李鹏珍, 戎郁萍. 氮磷添加对草甸草原土壤氮磷转化功能基因丰度的影响. *生态学报*, 2023, 43(1): 313-326.
- [ 14 ] 刘妍霁, 刘子恺, 金圣圣, 邓慧玉, 沈菊培, 贺纪正. 亚热带森林土壤氨氧化微生物和反硝化微生物功能基因丰度对氮磷输入响应. *应用生态学报*, 2023, 34(3): 639-646.
- [ 15 ] Alberty R A. Thermodynamics of the mechanism of the nitrogenase reaction. *Biophysical Chemistry*, 2005, 114(2/3): 115-120.
- [ 16 ] Tang Y Q, Zhang X Y, Li D D, Wang H M, Chen F S, Fu X L, Fang X M, Sun X M, Yu G R. Impacts of nitrogen and phosphorus additions on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and denitrifying bacteria in Chinese fir plantations. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 103: 284-293.
- [ 17 ] Chen Y L, Hu H W, Han H Y, Du Y, Wan S Q, Xu Z W, Chen B D. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in response to fertilization and mowing in a temperate steppe in Inner Mongolia. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 89(1): 67-79.
- [ 18 ] 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.
- [ 19 ] Reed S C, Townsend A R, Taylor P G, Cleveland C C. Phosphorus cycling in tropical forests growing on highly weathered soils. Bünemann E, Oberson A, Frossard E. *Phosphorus in Action*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011: 339-369.
- [ 20 ] 曾泉鑫, 曾晓敏, 林开森, 张秋芳, 程蕾, 周嘉聪, 林巧玉, 陈岳民, 徐建国. 亚热带毛竹林土壤磷组分和微生物对施氮的响应. *应用生态学报*, 2020, 31(3): 753-760.
- [ 21 ] Deng Q, Hui D, Dennis S, Reddy K C. Responses of terrestrial ecosystem phosphorus cycling to nitrogen addition: A meta-analysis. *Global Ecology and Biogeography*, 2017, 26(6): 713-728.
- [ 22 ] Wang X H, Li S, Zhu B, Homyak P M, Chen G S, Yao X D, Wu D M, Yang Z J, Lyu M K, Yang Y S. Long-term nitrogen deposition inhibits soil priming effects by enhancing phosphorus limitation in a subtropical forest. *Global Change Biology*, 2023, 29(14): 4081-4093.

- [23] Zeng Q X, Liu Y Y, Zhang Q F, Mei K C, Yuan X C, Lin K M, Zhou J C, Wu X X, Xu M, Chen Y. Contrasting priming effect intensities and drivers in single and repeated glucose additions to a forest soil receiving long-term N fertilization. *Biology and Fertility of Soils*, 2024, 60(1): 53-68.
- [24] Bauhus J, Khanna P K. Carbon and nitrogen turnover in two acid forest soils of southeast Australia as affected by phosphorus addition and drying and rewetting cycles. *Biology and Fertility of Soils*, 1994, 17(3): 212-218.
- [25] Peng Z H, Lu Y, Li L B, Zhao Q, Feng Q, Gao Z M, Lu H Y, Hu T, Yao N, Liu K Y, Li Y, Fan D L, Guo Y L, Li W J, Lu Y Q, Weng Q J, Zhou C C, Zhang L, Huang T, Zhao Y, Zhu C R, Liu X G, Yang X W, Wang T, Miao K, Zhuang C Y, Cao X L, Tang W L, Liu G S, Liu Y L, Chen J, Liu Z J, Yuan L C, Liu Z H, Huang X H, Lu T T, Fei B H, Ning Z M, Han B, Jiang Z H. The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*). *Nature Genetics*, 2013, 45: 456-461.
- [26] Song X Z, Zhou G M, Jiang H, Yu S Q, Fu J H, Li W Z, Wang W F, Ma Z H, Peng C H. Carbon sequestration by Chinese bamboo forests and their ecological benefits: assessment of potential, problems, and future challenges. *Environmental Reviews*, 2011, 19: 418-428.
- [27] Zeng Q X, Fan Y X, Zhang Q F, Yuan X C, Lin K M, Zhou J C, Lin H Y, Xie H, Cui J Y, Wu Y, Chen Y. Differential factors determine the response of soil P fractions to N deposition in wet and dry seasons in a subtropical Moso bamboo forest. *Plant and Soil*, 2024, 498(1): 161-179.
- [28] Carter, M., Gregorich, E. Soil sampling and methods of analysis (Second ed.). CRC Press, Boca Raton, USA, 2007.
- [29] Watanabe F S, Olsen S R. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO<sub>3</sub> extracts from soil. *Soil Science Society of America Journal*, 1965, 29(6): 677-678.
- [30] Chu H Y, Fujii T, Morimoto S, Lin X G, Yagi K, Hu J L, Zhang J B. 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(2): 485-491.
- [31] 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.
- [32] 葛江飞, 杨为中, 高雄飞, 孙思哲, 陈俊辉, 梁辰飞, 徐秋芳, 郭奇峰, 秦华. 不同经营强度下毛竹丛枝菌根共生体对氨氧化微生物的影响. *土壤学报*, 2021, 58(2): 505-513.
- [33] 王兴萌, 陈志豪, 李永春, 吴家森, 李永夫, 钟斌, 梁辰飞, 徐秋芳. 氮素形态及配比对毛竹和青冈实生苗生长特性的影响. *生态学杂志*, 2019, 38(9): 2655-2661.
- [34] Teng Q M, Lu X N, Zhang Q Q, Cai L L, Sardar M F, Li Y F, Abbas T, Li Y, Chang S X, Li Y C. Litterfall quality modulates soil ammonium and nitrate supply through altering microbial function in bamboo encroachment of broadleaf forests. *Geoderma*, 2023, 437: 116592.
- [35] Zhang Q F, Zhou J C, Li X J, Liu C C, Lin W S, Zheng W, Chen Y M, Yang Y S. Nitrogen addition accelerates the nitrogen cycle in a young subtropical *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) plantation. *Annals of Forest Science*, 2019, 76: 1-15.
- [36] 于少兰, 乔延路, 韩彦琼, 张晓华. 好氧氨氧化微生物系统发育及生理生态学差异. *微生物学通报*, 2015, 42(12): 2457-2465.
- [37] Lin Z Y, Huang W, Zhou J, He X J, Wang J L, Wang X T, Zhou J. The variation on nitrogen removal mechanisms and the succession of ammonia oxidizing Archaea and ammonia oxidizing bacteria with temperature in biofilm reactors treating saline wastewater. *Bioresource Technology*, 2020, 314: 123760.
- [38] 马瑞, 赵伟焯, 王智慧, 罗红燕, 蒋先军. 紫色土硝化过程中氨氧化细菌和古菌对温度的响应. *土壤通报*, 2018, 49(6): 1348-1354.
- [39] 陈红, 冯云, 周建梅, 徐振国, 廉超, 郭起荣. 毛竹根系生物量分布与季节动态变化. *生态环境学报*, 2013, 22(10): 1678-1681.
- [40] 王欣丽, 朱飞, 姚静, 姜永见, 王芸, 任丽英. 长期施肥对酸性土壤氨氧化微生物群落的影响. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24(2): 375-382.
- [41] Stopnisek N, Gubry-Rangin C, Höffler S, Nicol G W, Mandic-Mulec I, Prosser J I. Thaumarchaeal ammonia oxidation in an acidic forest peat soil is not influenced by ammonium amendment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(22): 7626-7634.
- [42] 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.
- [43] 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: 976-979.
- [44] 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.
- [45] Chen X, Zhang L M, Shen J P, Wei W X, He J Z. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing Archaea and bacteria in an acid paddy soil. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(3): 323-331.