

## 有机碳氮添加对酸性森林土壤氨氧化过程的影响\*

徐杰<sup>1, 2</sup> 韩成<sup>1, 2</sup> 张金波<sup>1, 2</sup> 邓欢<sup>1, 2</sup> 钟文辉<sup>1, 2†</sup>

(1 南京师范大学地理科学学院, 南京 210023)

(2 江苏省物质循环与污染控制重点实验室, 南京 210023)

**摘要** 以亚热带酸性森林土壤为研究对象, 开展了微宇宙室内培养实验, 设置了有机碳和有机氮添加处理, 分析了土壤硝化活性和氨氧化古菌 (Ammonia-oxidizing archaea, AOA)、氨氧化细菌 (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 的功能基因丰度, 研究了外源有机碳和有机氮对酸性森林土壤氨氧化过程的影响规律。结果表明: 外源有机氮添加显著刺激了酸性森林土壤硝化活性, 乙炔抑制实验表明自养氨氧化对酸性森林土壤硝化过程的贡献率 > 90%。有机碳添加对土壤硝化活性未有显著影响, 同时添加有机碳和无机铵态氮也未显著提高土壤硝化活性, 而外源有机氮添加提高了土壤矿化速率并导致土壤NH<sub>3</sub>浓度升高, 可能是土壤硝化活性、AOA和AOB数量显著增加的主要原因。

**关键词** 氨氧化古菌;  $\gamma$ -氨基丁酸; 矿化; 有机氮

**中图分类号** S154 **文献标识码** A

氨氧化过程是地球氮素循环的限速步骤, 是学术界关注的研究热点<sup>[1]</sup>。上百年来, 氨氧化细菌 (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 一直被认为是地球氨氧化过程的主要驱动者<sup>[2-3]</sup>。然而, 2005年美国科学家从海洋环境中获得了一株泉古菌, 能够利用氨氧化获得能量, 同化无机碳合成生物质, 是严格的化能无机自养代谢氨氧化古菌 (Ammonia-oxidizing archaea, AOA)<sup>[4]</sup>。这一发现将氨氧化微生物从细菌域拓展到了古菌域, 改变了地球氮循环的经典理论。随后的大量研究发现, 土壤中不仅存在大量的AOA, 而且其数量通常高于AOB, 最高可达3 000倍之多<sup>[5]</sup>。然而, 数量优势并不一定具有功能意义, 稳定性同位素示踪研究表明, 数量上占弱勢的AOB在中性和碱性土壤中主导了氨氧化过程<sup>[6]</sup>, 而AOA则在酸性土壤氨氧化过程中发挥了重要作用<sup>[7]</sup>, 并能更好适应低氧胁迫

环境如水稻土<sup>[8]</sup>。同时, 乙炔抑制实验表明在复杂土壤环境中氨氧化古菌和细菌均为严格的化能无机自养代谢类型<sup>[6-7, 9]</sup>。

复杂环境如土壤中存在大量的有机碳和有机氮, 然而, 土壤中氨氧化古菌和细菌能否同化有机碳异养生长及其对土壤硝化过程的贡献一直是研究难点。2011年, 科学家获得第一株来自于中性土壤环境的氨氧化古菌*Nitrososphaera viennensis*, 并发现其主要通过化能无机自养代谢生长, 但有机碳 (如丙酮酸) 添加能显著刺激其增殖生长<sup>[10]</sup>。基因组分析也发现海洋氨氧化古菌具有异养生长的遗传基础<sup>[11]</sup>, 而最近的纯培养研究则发现酮戊二酸添加显著提高两株氨氧化古菌的活性<sup>[12]</sup>。事实上, 与中性/碱性土壤中的氨氧化古菌如*N. viennensis*相比, 酸性土壤中的氨氧化古菌与海洋氨氧化古菌具有更近的系统发育亲缘关系<sup>[13]</sup>, 但

\* 国家自然科学基金项目 (41271255, 41301260) 和国家重点研发计划项目 (2016YFD0200302) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 41271255, 41301260) and the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0200302)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhongwenhui@njnu.edu.cn

作者简介: 徐杰 (1991—), 男, 江苏泰州人, 硕士研究生, 主要从事土壤硝化及相关微生物研究。E-mail: xjcon@vip.qq.com

收稿日期: 2016-07-04; 收到修改稿日期: 2017-01-20; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2017-03-03

纯培养研究表明这些氨氧化古菌对有机碳的响应规律明显不一致<sup>[7, 12]</sup>。

针对复杂土壤环境的分子生态学和表观通量观测则表明异养硝化过程可能在酸性土壤中发挥了重要作用。Shen等<sup>[14]</sup>发现我国典型土壤中AOA和AOB的数量在区域尺度上的分布与土壤有机质含量呈显著正相关关系,而室内培养实验也发现有机物质能够显著刺激土壤异养硝化作用<sup>[15]</sup>。利用不同施肥管理的长期定位试验,也有研究表明相较于无机氮肥,长期施用有机肥更加显著地激发了土壤硝化活性<sup>[16]</sup>。针对湖南祁阳旱地红壤的研究则表明:有机无机配施条件下土壤中AOA和AOB的数量最高,而单施化肥条件下数量最低<sup>[17]</sup>。我们的前期研究也发现,施有机肥条件下旱地土壤AOA *amoA*基因拷贝数显著高于未施有机肥土壤<sup>[18]</sup>。也有研究表明有机氮矿化导致土壤铵态氮浓度增加,并能显著刺激土壤硝化活性<sup>[19]</sup>,无机铵态氮添加则对酸性土壤氨氧化未有显著影响<sup>[20]</sup>。然而,酸性土壤氨氧化有机物添加(如外源有机氮、有机碳、有机碳配施无机氮)的响应规律尚未有系统研究。据此,本研究针对亚热带酸性森林土壤,设置了微宇宙室内培养实验,通过添加不同类型的有机碳源、有机氮源、有机碳源配施无机氮、并利用C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>对自养氨氧化过程的抑制作用<sup>[21-22]</sup>,研究不同形态的氮源对土壤氨氧化活性及氨氧化细菌和古菌数量的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区概况

研究区位于福建建瓯万木林自然保护区,地处建瓯市西南29 km的房道乡境内,地理坐标为东经118°02'22"~118°09'23",北纬27°02'28"~27°03'32",总面积189 hm<sup>2</sup>。自然保护区为低山丘陵地带,海拔234~556 m。气候属于中亚热带季风型气候,水、光、热资源丰富,年均气温18.7℃,年均降雨量为1 664 mm。保护区森林覆盖率高达96.1%,植被类型丰富。选择其中的优势种群杉木林采集土壤。土壤为花岗岩发育的红壤。

### 1.2 供试土壤

供试土壤采集于2014年12月11日。采用多点混合采样法采集表层(0~15 cm)土壤,装入自封袋内,带回实验室,去除杂物、细根,过2 mm

筛,4℃保存。采用玻璃电极法测定土壤pH(水土比为2.5:1);使用2 mol L<sup>-1</sup>KCl浸提土壤,土壤硝态氮(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)和铵态氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)含量分别通过NAS试剂(4-(苯氨基)苯磺酸)比色法<sup>[23]</sup>、靛酚蓝比色法<sup>[24]</sup>测定。土壤基本理化指标如下:pH4.61、有机碳37.8 g kg<sup>-1</sup>、全氮2.02 g kg<sup>-1</sup>、铵态氮68.0 mg kg<sup>-1</sup>、硝态氮5.92 mg kg<sup>-1</sup>。

### 1.3 土壤微域培养实验设置

前期研究发现植物根系分泌物能选择性的富集古菌<sup>[25]</sup>,而氮、磷、钾及铁胁迫下,植物根系分泌物中果糖、葡萄糖、柠檬酸、丙三醇、L-谷氨酸、γ-氨基丁酸显著增加<sup>[26]</sup>。据此设置了微宇宙培养实验I,针对5种有机物(本研究中统一将不含氮有机物简称为有机碳,含氮有机物简称为有机氮),包括有机碳:葡萄糖(GLU)、柠檬酸(CA)、丙酮酸(PA),有机氮:γ-氨基丁酸(GABA)、L-谷氨酸(GAA),研究外源有机物添加对土壤氨氧化过程的影响。具体实验设置如下:将过筛后的新鲜土壤混匀,称取30.0 g(干土重)土样置于120 ml血清瓶,按干土重的0.1%向土壤中添加不同有机物,同时添加(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,设置零时刻所有处理包括对照土壤NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N的初始浓度均为200 mg kg<sup>-1</sup>,并调节土壤水分至60%的最大持水量。所有血清瓶涂抹硅橡胶密封后置于生化培养箱。28℃恒温、避光连续培养14 d。培养7 d后进行换气以确保血清瓶内氧气充足,14 d培养结束后破坏性采样。每个血清瓶中采集10 g土壤样品(干土重),以作NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N和NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N含量测定。

实验I结果发现γ-氨基丁酸显著促进了土壤氨氧化能力。据此设置了实验II微宇宙培养实验,培养条件如血清瓶、土壤、温度等如实验I所述。具体处理设置如下:①对照处理(CK)、②(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>处理(AS)、③γ-氨基丁酸处理(GABA)、④丁酸+(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>处理(BA+AS),每个处理均有乙炔抑制和无乙炔抑制培养,共计4×2×3×6=144个重复。AS处理、GABA处理、BA+AS处理统一外加4.0 mg的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N。此外,BA+AS处理和GABA处理加入的丁酸碳量一致。未添加外源有机物的2个处理(即CK处理、AS处理)土壤TOC含量保持不变,约为37.8 g kg<sup>-1</sup>,其余2个处理土壤TOC含量增加1.2%左右。最后,使用Agilent注射器充入C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>(100 Pa),密封培养42 d,每7天破坏性采样一次,每隔6 d上午固定10:00

开始破坏性采样并进行换气（相应处理重新补充 100 Pa 的  $C_2H_2$ ）。分别收集每个血清瓶中的土壤样品，混匀后取出约 1 g 土壤（干土重）， $-80^\circ C$  保存于超低温冰箱待用；另采集 10 g 土壤（干土重）以作  $NO_3^-$ -N 和  $NH_4^+$ -N 含量测定。具体换气操作：使用真空泵将血清瓶抽气至 40% 负压后，打开瓶塞通气 10 min，重复操作 3 次后结束换气；最后乙炔抑制处理补加 100 Pa 的  $C_2H_2$ ，充气完毕后密封，继续恒温培养。

针对实验 II 微宇宙培养实验，开展了分子生态学分析。选择各个处理（无乙炔抑制）零时刻、培养第 28 天、第 42 天的土壤样品提取土壤微生物基因组 DNA。

#### 1.4 土壤微生物基因组 DNA 提取和实时荧光定量 PCR 分析

采用试剂盒（MP Biomedicals, LLC）进行土壤微生物基因组 DNA 提取实验，具体土壤 DNA 提取步骤严格按照试剂盒操作说明完成。最终得到的土壤微生物基因组 DNA 样品一部分采用 NanoDrop 2000 测定 DNA 浓度和纯度，另一部分  $-20^\circ C$  低温保存待用。

利用实时荧光定量 PCR 对土壤中的 AOA 和 AOB 进行定量分析。采用基于 SYBR green 染料法的定量 PCR 技术检测土壤中 *amoA* 功能基因丰度，AOA 和 AOB 定量 PCR 分析的分子靶基因及反应条件如表 1 所示<sup>[27]</sup>。

表 1 荧光定量 PCR 扩增引物及反应条件

Table 1 Fluorescent quantitation PCR amplification primers and reaction conditions in the study

基因 Gene	引物序列 (5'-3') The sequence of primers (5'-3')	片段长度 The length of fragment	荧光定量 PCR 条件 Fluorescent quantitation PCR conditions
氨氧化细菌 <i>amoA</i> 基因 <i>amoA</i> gene of ammonia-oxidizing bacteria	<i>amoA</i> -1F GGGGTTTCTACTGGTGGT <i>amoA</i> -2R CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	491 bp	$94^\circ C$ , 5 min; $40 \times (94^\circ C, 30 s; 57^\circ C, 45 s; 72^\circ C, 60 s; 85^\circ C + \text{读板})$ ; 溶解曲线 $65.0 \sim 95.0^\circ C$ , 增加 $0.5^\circ C$ , 5 s + 读板
氨氧化古菌 <i>amoA</i> 基因 <i>amoA</i> gene of ammonia-oxidizing archaea	Arch- <i>amoA</i> F TAATGGTCTGGCTTAGACG Arch- <i>amoA</i> R CGGCCATCCATCTGTATGT	635 bp	$94^\circ C$ , 5 min; $40 \times (94^\circ C, 30 s; 55^\circ C, 30 s; 72^\circ C, 30 s; 83^\circ C + \text{读板})$ ; 溶解曲线 $65.0 \sim 95.0^\circ C$ , 增加 $0.5^\circ C$ , 5 s + 读板

采用大连宝生物工程有限公司的 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Perfect Real Time) 试剂盒于 CFX96 Real-Time PCR System 扩增仪上分析。定量 PCR 选择 25  $\mu l$  反应体系，包括 12.5  $\mu l$  SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>、上下游引物各 0.5  $\mu l$  ( $20 \text{ nmol } \mu l^{-1}$ )、2  $\mu l$  DNA 模板和 9.5  $\mu l$  的灭菌超纯水。阴性对照用灭菌超纯水代替 DNA 模板。

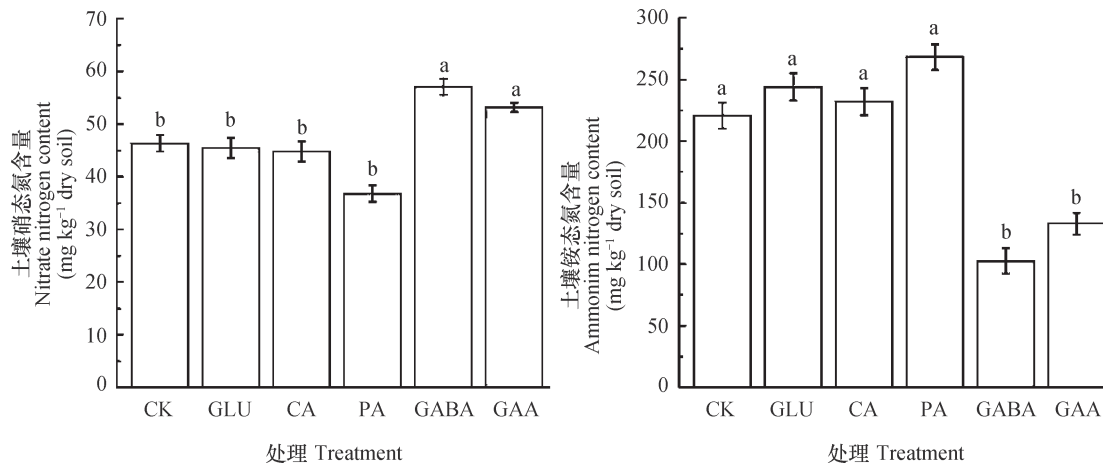
#### 1.5 数据分析

文中结果均以干土重来表达，利用 SPSS18.0 软件，进行了相关统计分析。采用 Tukey's HSD 分析不同处理间土壤  $NO_3^-$ -N、 $NH_4^+$ -N、矿化速率及细菌、古菌的 *amoA* 基因拷贝数的显著性差异。所有显著性水平均为  $p < 0.05$ 。使用 Origin 9.0、Adobe Illustrator CS6.0 进行图像绘制。

## 2 结 果

### 2.1 有机物添加对土壤硝化活性的影响

土壤中硝态氮浓度增加是硝化过程的主要特征。与 CK 比较，在等量有机氮输入情况下， $\gamma$ -氨基丁酸、L-谷氨酸显著促进了土壤硝化过程，土壤中  $NO_3^-$ -N 积累量显著增加；而葡萄糖 (GLU)、柠檬酸 (CA) 和丙酮酸 (PA) 添加土壤中  $NO_3^-$ -N 含量无显著性变化 (图 1)，表明这些有机碳源添加未能促进土壤硝化活性。土壤  $NH_4^+$ -N 含量的变化 (图 1) 与  $NO_3^-$ -N 的变化相反， $\gamma$ -氨基丁酸、L-谷氨酸添加土壤中  $NH_4^+$ -N 含量显著低于 CK 处理，而葡萄糖 (GLU)、柠檬酸 (CA) 和丙酮酸 (PA) 添加土壤中的  $NH_4^+$ -N 含量与对照处理 CK 相比无显



注: CK, 对照, 土壤中无有机物添加; GLU, 添加葡萄糖; CA, 添加柠檬酸; PA, 添加丙酮酸; GABA, 添加 $\gamma$ -氨基丁酸; GAA, 添加L-谷氨酸。图中值为平均值, 误差线为标准差 ( $n = 3$ )。不同字母代表处理间的差异显著 ( $p < 0.05$ )。下同 Note: CK, control, no addition of organic carbon or nitrogen; GLU, amended with glucose; CA, amended with citric acid; PA, amended with pyruvic acid; GABA, amended with gamma-amino butyric acid; GAA, amended with L-glutamic acid. Data in the figure are means of triplicates and error bars represent standard deviation. Different letters above the columns indicate significant difference between treatments at 0.05 level. The same below

图1 有机碳和有机氮添加对亚热带酸性森林土壤氨氧化过程的影响

Fig. 1 Effects of amendments of organic carbon and organic nitrogen on ammonification processes in subtropical acidic forest soil

著变化。这些结果表明, 有机氮源显著促进了土壤氨氧化过程, 而有机碳源添加对土壤氨氧化过程无显著影响。

## 2.2 有机氮源和无机氮源对土壤自养氨氧化过程的影响

充入 $C_2H_2$ 培养42 d的所有处理土壤中 $NO_3^-$ -N含量基本保持不变(图2b), 而由于有机质的矿化作用, 土壤 $NH_4^+$ -N含量在培养第7天产生了显著的增加, 此后也未出现显著变化(图2d)。并且充入 $C_2H_2$ 培养42 d的所有处理土壤中 $NO_3^-$ -N累积量显著低于未冲入 $C_2H_2$ 处理。比较加乙炔和未加乙炔处理中土壤 $NO_3^-$ -N的最终产量, 计算得出42 d后各处理自养硝化作用对土壤总硝化作用的贡献率, 结果表明自养硝化主导了酸性土壤氨氧化过程: GABA处理(96.5%a) > AS处理(93.0%b)、BA+AS处理(93.7%b)、CK处理(92.7%b)。

在没有乙炔抑制条件下, 各处理土壤均表现出明显的硝化作用, 培养过程中 $NO_3^-$ -N均显著增加。CK空白对照土壤中 $NO_3^-$ -N累计量约为118.5 mg kg<sup>-1</sup>, 净硝化速率为22.7 mg kg<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> ( $R^2=0.926$ ); BA+AS处理与CK处理、AS处第42天土壤 $NO_3^-$ -N含量没有显著差异, 外源有机碳丁酸对土壤硝化活性无显著影响; 值得注意的是, GABA处理土壤中

$NO_3^-$ -N含量最高, 达到180.5 mg kg<sup>-1</sup>, 显著高于其他所有处理。

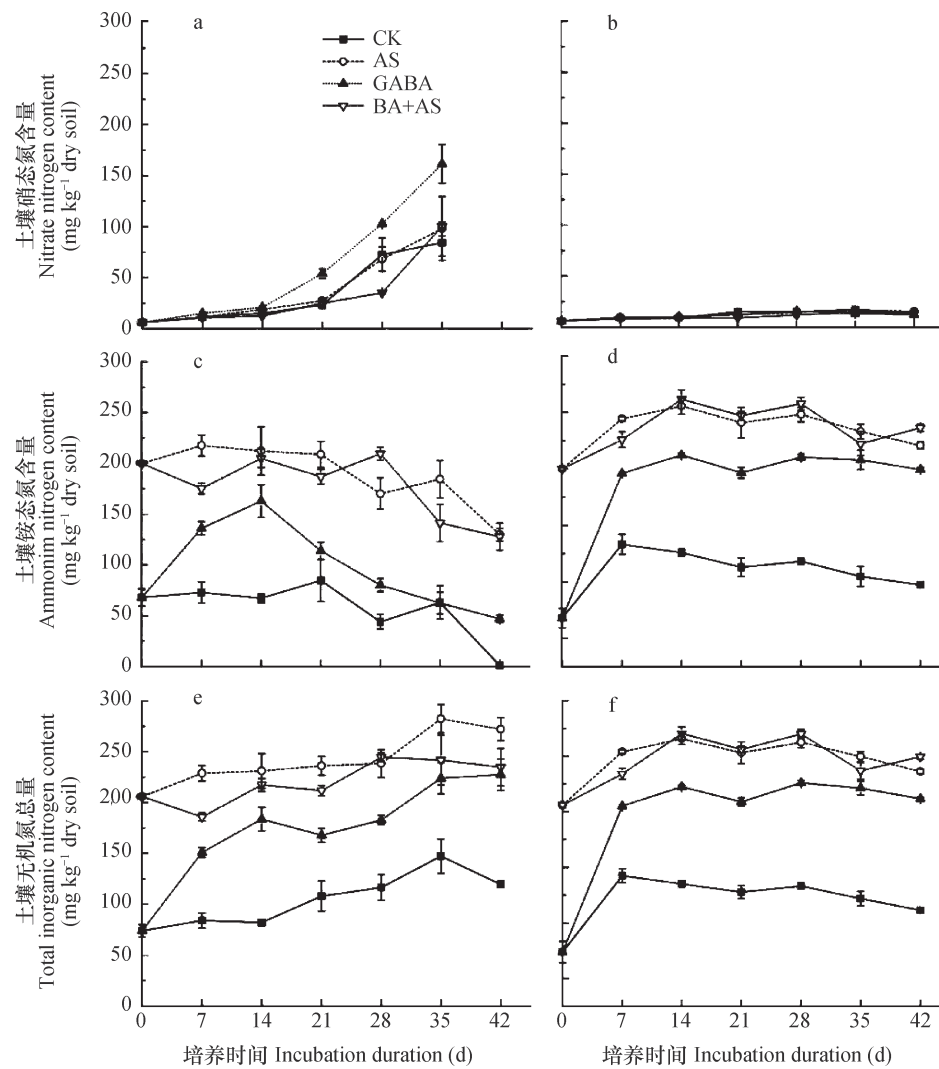
土壤 $NH_4^+$ -N含量的变化(图2c)也较好地印证了土壤 $NO_3^-$ -N的变化。未加 $C_2H_2$ 条件下, 4个处理的土壤 $NH_4^+$ -N含量总体呈下降趋势, 但具体变化趋势并不相同: CK、AS和BA+AS处理一直呈下降趋势而GABA处理则是先上升再下降趋势。

在整个培养过程中, 乙炔抑制的处理无机氮总量( $NO_3^-$ -N+ $NH_4^+$ -N)在培养后期保持稳定, 基本不变(图2f); 而没有乙炔抑制的所有处理由于土壤本底有机物的矿化作用, 无机氮总量( $NO_3^-$ -N+ $NH_4^+$ -N)均呈上升趋势, 并在培养结束后均显著高于未培养前。不加乙炔时, CK、AS和BA+AS处理在培养过程中无机氮总量上升趋势比较平稳; 与这3个处理不同, GABA处理在培养29~42 d无机氮总量迅速上升(图2e), 并且该处理(不加乙炔)在0~28 d和29~42 d的氮矿化速率(表2)显著高于其余3个处理。

## 2.3 土壤氨氧化古菌和细菌amoA基因的丰度变化

实验II不同碳氮源添加培养过程土壤氨氧化古菌和细菌amoA基因丰度变化如图3所示。42 d培养期内, 各个处理土壤的AOAamoA基因丰度均呈上升趋势, 各个处理的不同采样时间(0、28、





注：CK，对照，土壤中无物质添加；AS，添加硫酸铵；GABA，添加 $\gamma$ -氨基丁酸；BA+AS，添加丁酸和硫酸铵。图2 a、c、e和图2 b、d、f分别表示无乙炔抑制和乙炔抑制培养。图中值为平均值，误差线为标准差 ( $n = 3$ )。下同 Note: CK, control, no addition of organic carbon or nitrogen; AS, amended with ammonium sulfate; GABA, amended with gamma-aminobutyric acid; BA+AS, amended with butyric acid and ammonium sulfate. Soil were incubated in the absence (a, c, e) or presence (b, d, f) of  $C_2H_2$ . Data in the figure are means of triplicates and error bars represent standard deviation. The same below

图2 亚热带酸性森林土壤添加 $\gamma$ -氨基丁酸和  $(NH_4)_2SO_4$  培养过程中土壤氮含量的变化

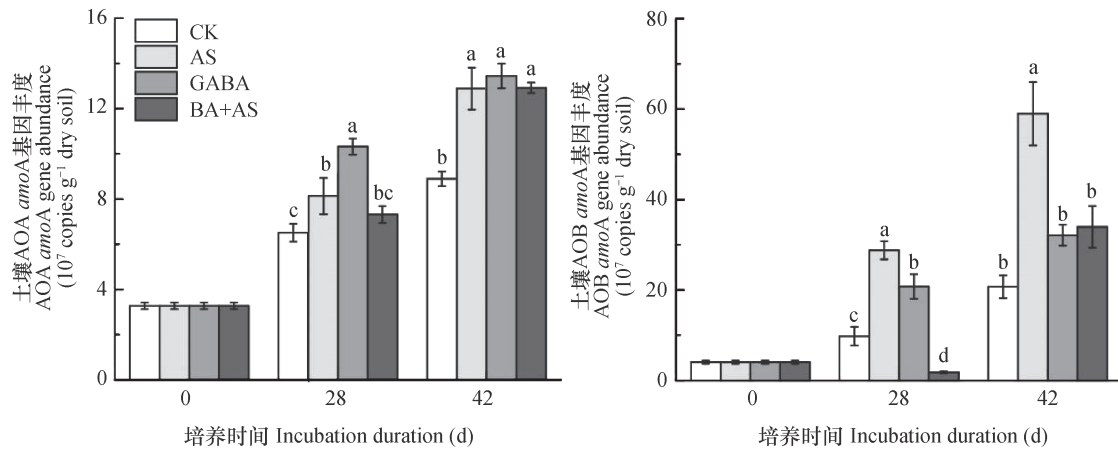
Fig. 2 Variations of the contents of nitrate (a, b), ammonium (c, d) and total inorganic nitrogen (e, f) in the subtropical acidic forest soil amended with gamma-aminobutyric acids and ammonium sulfate under incubation in the absence (a, c, e) or presence (b, d, f) of  $C_2H_2$

表2 培养后各处理土壤的氮矿化速率

Table 2 N mineralization rate in the incubated soils relative to treatment

培养时间 Incubation duration (d)	氮矿化速率 N mineralization rate ( $mg\ kg^{-1}\ d^{-1}$ )			
	CK	AS	GABA	BA+AS
0 ~ 28	$1.52 \pm 0.35b$	$1.16 \pm 0.35b$	$3.89 \pm 0.19a$	$1.38 \pm 0.12b$
29 ~ 42	$1.08 \pm 0.10b$	$1.58 \pm 0.19b$	$3.66 \pm 0.28a$	$0.69 \pm 0.31b$

注：平均值  $\pm$  标准差。同一行中字母不同代表处理间差异显著 ( $n = 3, p < 0.05$ ) Note: Means  $\pm$  standard deviation. Different letters indicate significant difference between treatments ( $n = 3, p < 0.05$ )



注：图中值为平均值，误差线为标准差。直方柱上不同字母代表簇内不同处理间的显著差异 ( $n = 3, p < 0.05$ ) Note: Data are means of triplicates and error bars stand for standard deviations. Different letters above the columns in a cluster indicate significant difference between treatments ( $n = 3, p < 0.05$ )

图3  $\gamma$ -氨基丁酸和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  对亚热带酸性森林土壤中氨氧化古菌 (AOA) *amoA* 基因丰度和氨氧化细菌 (AOB) *amoA* 基因丰度的影响

Fig. 3 Effects of amendment of gamma-amino butyric acid and ammonium sulfate on abundance of *amoA* genes in ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the subtropical acidic forest soil

42 d) 之间存在显著差异。培养28 d后, GABA处理的土壤AOA*amoA*基因丰度显著高于CK处理和BA+AS处理, AS处理的土壤AOA*amoA*基因丰度显著高于CK处理, 而BA+AS处理和CK处理无显著差异。培养42 d后, BA+AS处理的土壤AOA*amoA*基因丰度增加尤为明显 (76.6%); AS、GABA、BA+AS三个处理的土壤AOA*amoA*基因丰度显著高于CK处理, 相互之间并无显著性差异。

整个培养期间, 与氨氧化古菌类似, 土壤氨氧化细菌AOB的*amoA*基因丰度显著上升, 但各处理土壤中*amoA*基因丰度的变化与AOA不尽相同, 存在着较大区别 (图3)。CK、AS、GABA处理土壤AOB*amoA*基因丰度变化一直呈上升趋势并且上升显著; 不同于其他处理, BA+AS处理的土壤AOB*amoA*基因丰度先减少后增加。第28天, 各处理间土壤的AOB*amoA*基因丰度大小关系为: AS > GABA > CK > BA+AS, 且各处理间均有显著性差异。42 d培养结束后, 4个处理间土壤AOB*amoA*基因丰度的大小关系又发生了变化: AS处理保持之前显著的增长速度, 第42天的土壤AOB*amoA*基因丰度仍显著高于其余三个处理; GABA处理的土壤AOB*amoA*基因丰度相较前28 d增长速度有所减慢, 而BA+AS处理的基因丰度则在36~42 d期间出现了迅速增加, 由28 d时显著低于CK处理变为42 d时显著高于CK处理。

### 3 讨论

#### 3.1 外源有机碳、氮对硝化活性的影响

有机碳添加对土壤硝化活性未有显著影响, 表明本研究中氨氧化微生物同化有机碳并进行异养硝化的作用可以忽略不计。葡萄糖、柠檬酸和丙酮酸对亚热带酸性森林土壤土壤硝化活性没有显著影响; 而另外两种物质L-谷氨酸和 $\gamma$ -氨基丁酸能够刺激土壤硝化活性, 促进土壤 $\text{NO}_3^-$ -N的积累。L-谷氨酸和 $\gamma$ -氨基丁酸与葡萄糖、柠檬酸、丙酮酸最显著的差异在于: 前两者分子中含有氨氧化微生物的底物—氨氮, 但所有处理均添加等量的 $\text{NH}_4^+$ -N, 仅从底物的增加并不能解释L-谷氨酸和 $\gamma$ -氨基丁酸对土壤硝化作用的刺激。这些结果表明, 与外加的无机铵态氮相比, 土壤有机氮矿化产生的氨分子更容易被氨氧化微生物所利用, 进一步刺激了土壤硝化活性。其中的可能原因是, 有机氮矿化的异养微生物细胞与自养氨氧化微生物细胞紧密接触, 异养微生物体内矿化出的 $\text{NH}_3$ 通过细胞壁直接扩散进入了氨氧化古菌或者细菌体内, 提升了氨氧化微生物的活性, 促进了土壤硝化强度<sup>[28]</sup>。同时, 微生物矿化有机氮生长的过程中, 也可能产生一些中间代谢产物, 这些产物可能有利于氨氧化古菌和细菌的生长, 刺激土壤硝化作用, 但具体的机制目前仍不清楚<sup>[7, 12]</sup>。此外, 有机氮矿化具有一定的致

碱作用<sup>[29]</sup>, 而土壤pH的提高则能显著提升NH<sub>3</sub>浓度, 进而促进氨氧化微生物活性<sup>[30]</sup>。

### 3.2 外源有机碳、氮对氨氧化微生物的影响

在对无机氮源和有机氮源的研究中, 0~28 d内BA+AS处理土壤NO<sub>3</sub>-N积累量显著低于其他处理, AOB数量的减少是其主要原因。BA+AS处理添加的丁酸具有一定的生物毒性, AOB的生长受到了明显地抑制, 而AOA并未受到影响。相较于AOB, AOA具有更强的环境抗逆性, 其原因可能古菌细胞含有独特的膜脂及醚脂键与长链异戊二烯相连的膜结构<sup>[6]</sup>。28 d以后, 丁酸毒性减弱或被微生物矿化分解, AOB的生长不再受到抑制。

所有处理的土壤无机氮总量呈现上升趋势, 说明在培养过程中, 土壤的矿化作用不断向土壤中输入NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N。在适宜的温度及水分环境下, 未外加铵氮的CK处理土壤AOA与AOB的*amoA*基因丰度相比培养前显著增加, 间接说明矿化产生的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N刺激了土壤中AOA和AOB的生长。已有研究表明AOB具有专性好氧的化能无机自养生存策略<sup>[31]</sup>, 无机氮添加能够显著刺激AOB种群数量的增长<sup>[32-33]</sup>, 与本研究的结果一致, 但无机氮肥的施用不会影响土壤AOB群落的组成结构<sup>[34]</sup>。本研究中各个处理AOB的增长主要归因于土壤有机物矿化产生的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N的刺激。相较于无机氮, 有机氮更能刺激AOA的生长<sup>[35]</sup>, 由于土壤本底有机物矿化产生的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, AS处理土壤AOA也有着显著增加, 但增长幅度并没有AOB显著。AOA和AOB的增长显著刺激了AS处理土壤硝化活性。由于矿化作用的进行, AS处理与GABA处理土壤AOA增加数量上的差距逐渐减小。由于GABA处理添加的氮源为易分解的有机氮源, 所以该处理矿化增加的无机氮显著高于CK、AS和BA+AS处理。根据Henderson-Hasselbalch方程计算得出GABA处理土壤平均NH<sub>3</sub>浓度(308.0 nmol L<sup>-1</sup>)显著低于AS处理(602.8 nmol L<sup>-1</sup>)。与AOB相比, AOA对氨分子具有更高的亲和力<sup>[36]</sup>和较低的基质抑制浓度(2~20 μmol L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>)<sup>[37]</sup>, 有机氮γ-氨基丁酸持续矿化所释放的低浓度NH<sub>3</sub>更利于土壤AOA利用。因此整个培养过程中, GABA处理土壤的硝化活性最高; 对比CK处理, 培养结束后, GABA处理AOA基因丰度显著增长, AOB并未有显著的增长。

## 4 结 论

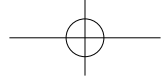
综上所述, 有机碳对亚热带酸性森林土壤硝化活性无显著影响, 而有机氮(γ-氨基丁酸、L-谷氨酸)则显著提高了土壤硝化活性。土壤有机氮矿化产生的NH<sub>3</sub>分子可能刺激了氨氧化细菌AOB和古菌AOA生长; 丁酸的存在可能会抑制森林土壤AOB的生长活性, 而AOA则不受影响。土壤中AOA和AOB对无机氮源((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、有机氮源(γ-氨基丁酸)具有不同的响应规律, 表明氨氧化古菌和细菌在土壤中的生长代谢方式可能存在明显差异。这些研究结果为阐明氨氧化微生物的代谢方式, 揭示土壤氮素转化的微生物调控机制提供了重要参考。

### 参 考 文 献

- [1] Koops H P, Purkhold U, Pommerening-Röser A, et al. The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria//The prokaryotes. New York: Springer, 2006: 778—811
- [2] Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, et al. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (12): 5368—5382
- [3] Winogradsky S. Recherchessur les organismes de la nitrification. *Annales de l'Institute Pasteur*, 1890, 4 (257): 11—12
- [4] Könneke M, Bernhard A E, José R, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437 (7058): 543—546
- [5] Leininger S, Urich T, Schloter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442 (7104): 806—809
- [6] Jia Z J, Conrad R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11 (7): 1658—1671
- [7] Lehtovirta-Morley L E, Stoecker K, Vilcinskis A, et al. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108 (38): 15892—15897

- [ 8 ] Wang B Z, Zhao J, Guo Z Y, et al. Differential contributions of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers to nitrification in four paddy soils. *The ISME Journal*, 2015, 9 ( 5 ) : 1062—1075
- [ 9 ] Xia WW, Zhang C X, Zeng X W, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. *The ISME Journal*, 2011, 5 ( 7 ) : 1226—1236
- [ 10 ] Tourna M, Stieglmeier M, Spang A, et al. *Nitrososphaeraviennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108 ( 20 ) : 8420—8425
- [ 11 ] Walker C B, de la Torre J R, Klotz M G, et al. *Nitrosopumilusmaritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107 ( 19 ) : 8818—8823
- [ 12 ] Qin W, Amin S A, Martens-Habbena W, et al. Marine ammonia-oxidizing archaeal isolates display obligate mixotrophy and wide ecotypic variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111 ( 34 ) : 12504—12509
- [ 13 ] Pester M, Rattei T, Flechl S, et al. *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions. *Environmental Microbiology*, 2012, 14 ( 2 ) : 525—539
- [ 14 ] Shen J P, Zhang L M, Di H J, et al. A review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chinese soils. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3, DOI: 10.3389/FMICB.2012.00296
- [ 15 ] Zhang J B, Wang J, Zhong W H, et al. Organic nitrogen stimulates the heterotrophic nitrification rate in an acidic forest soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 80: 293—295
- [ 16 ] 王敬, 程谊, 蔡祖聪, 等. 长期施肥对农田土壤氮素关键转化过程的影响. *土壤学报*, 2016, 53 ( 2 ) : 292—304  
Wang J, Cheng Y, Cai Z C, et al. Effects of long-term fertilization on key processes of soil nitrogen cycling in agricultural soil: A Review ( In Chinese ). *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53 ( 2 ) : 292—304
- [ 17 ] He J Z, Shen J P, Zhang L M, et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 ( 9 ) : 2364—2374
- [ 18 ] Wang X L, Han C, Zhang J B, et al. Long-term fertilization effects on active ammonia oxidizers in an acidic upland soil in China. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 84: 28—37
- [ 19 ] Levičnik-Höfferle Š, Nicol G W, Ausec L, et al. Stimulation of thaumarchaeal ammonia oxidation by ammonia derived from organic nitrogen but not added inorganic nitrogen. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 80 ( 1 ) : 114—123
- [ 20 ] Stopnišek N, Gubry-Rangin C, Höfferle Š, et al. Thaumarchaeal ammonia oxidation in an acidic forest peat soil is not influenced by ammonium amendment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 ( 22 ) : 7626—7634
- [ 21 ] Wessén E, Nyberg K, Jansson J K, et al. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management. *Applied Soil Ecology*, 2010, 45 ( 3 ) : 193—200
- [ 22 ] Hyman M R, Arp D J.  $^{14}\text{C}_2\text{H}_2$ - and  $^{14}\text{CO}_2$ -labeling studies of the de novo synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267 ( 3 ) : 1534—1545
- [ 23 ] Taylor A E, Zeglin L H, Dooley S, et al. Evidence for different contributions of archaea and bacteria to the ammonia-oxidizing potential of diverse Oregon soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 ( 23 ) : 7691—7698
- [ 24 ] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000  
Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry ( In Chinese ). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000
- [ 25 ] Simon H M, Jahn C E, Bergerud L T, et al. Cultivation of mesophilic soil crenarchaeotes in enrichment cultures from plant roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 ( 8 ) : 4751—4760
- [ 26 ] Carvalhais L C, Dennis P G, Fedoseyenko D, et al. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2011, 174 ( 1 ) : 3—11
- [ 27 ] Zhong W H, Bian B Y, Gao N, et al. Nitrogen fertilization induced changes in ammonia oxidation are attributable mostly to bacteria rather than archaea in greenhouse-based high N input vegetable soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 93: 150—159
- [ 28 ] De Boer W, Kowalchuk G A. Nitrification in acid soils: microorganisms and mechanisms. *Soil Biology*





- &Biochemistry, 2001, 33 (7) : 853—866
- [29] Cai Z J, Wang B, Xu M G, et al. Intensified soil acidification from chemical N fertilization and prevention by manure in an 18-year field experiment in the red soil of southern China. *Journal of Soils and Sediments*, 2015, 15 (2) : 260—270
- [30] Cheng Y, Wang J, Mary B, et al. Soil pH has contrasting effects on gross and net nitrogen mineralizations in adjacent forest and grassland soils in central Alberta, Canada. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 57: 848—857
- [31] 钟文辉, 蔡祖聪, 尹力初, 等. 种植水稻和长期施用无机肥对红壤氨氧化细菌多样性和硝化作用的影响. *土壤学报*, 2008, 45 (1) : 105—111
- Zhong W H, Cai Z C, Yin L C, et al. Effects of rice cultivation and long-term application of inorganic fertilizers on ammonium oxidizers diversity and nitrification of red soils (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45 (1) : 105—111
- [32] Hermansson A, Lindgren P E. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (2) : 972—976
- [33] 贺纪正, 张丽梅. 土壤氮素转化的关键微生物过程及机制. *微生物学通报*, 2013, 40 (1) : 98—108
- He J Z, Zhang L M. Key processes and microbial mechanisms of soil nitrogen transformation (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 40 (1) : 98—108
- [34] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Reviews in Microbiology*, 2001, 55 (1) : 485—529
- [35] Tourna M, Freitag T E, Nicol G W, et al. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (5) : 1357—1364
- [36] Verhamme D T, Prosser J I, Nicol G W. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *The ISME Journal*, 2011, 5 (6) : 1067—1071
- [37] 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

## Effects of Amendment of Organic Carbon or Nitrogen on Ammonia Oxidation in the Subtropical Acidic Forest Soil

XU Jie<sup>1, 2</sup> HAN Cheng<sup>1, 2</sup> ZHANG Jinbo<sup>1, 2</sup> DENG Huan<sup>1, 2</sup> ZHONG Wenhui<sup>1, 2†</sup>

(<sup>1</sup> School of Geography Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Provincial Key Laboratory of Materials Cycling and Pollution Control, Nanjing 210023, China)

(<sup>2</sup> Jiangsu Provincial Key Laboratory of Materials Cycling and Pollution Control, Nanjing 210023, China)

**Abstract** Samples of subtropical acidic forest soil were collected for incubation in an in-lab microcosm chamber. Some of the samples were amended with organic carbon or organic nitrogen. Then the incubated soil samples were analyzed for soil nitrification activity and abundance of functional genes of bacteria AOB and archaea AOA, and further for rules of extraneous organic carbon and organic nitrogen affecting ammonia oxidation in the soil. Results show that the amendment of extraneous organic nitrogen stimulated significantly soil nitrification activity. Acetylene inhibition tests demonstrate that autotrophic ammonification explained over 90% of the soil nitrification in the subtropical acidic forest soil. The addition of organic carbon did not have much effect on nitrification activity, nor did the amendment of organic carbon and inorganic ammonium simultaneously. However, the addition of organic nitrogen enhanced soil N mineralization, thus causing soil ammonia content to increase, which may probably be the main cause of the significant increases in soil nitrification activity and abundance of AOA and AOB.

**Key words** Ammonia-oxidizing archaea; Gamma-amino butyric acid; Mineralization; Organic nitrogen

(责任编辑: 卢 萍)