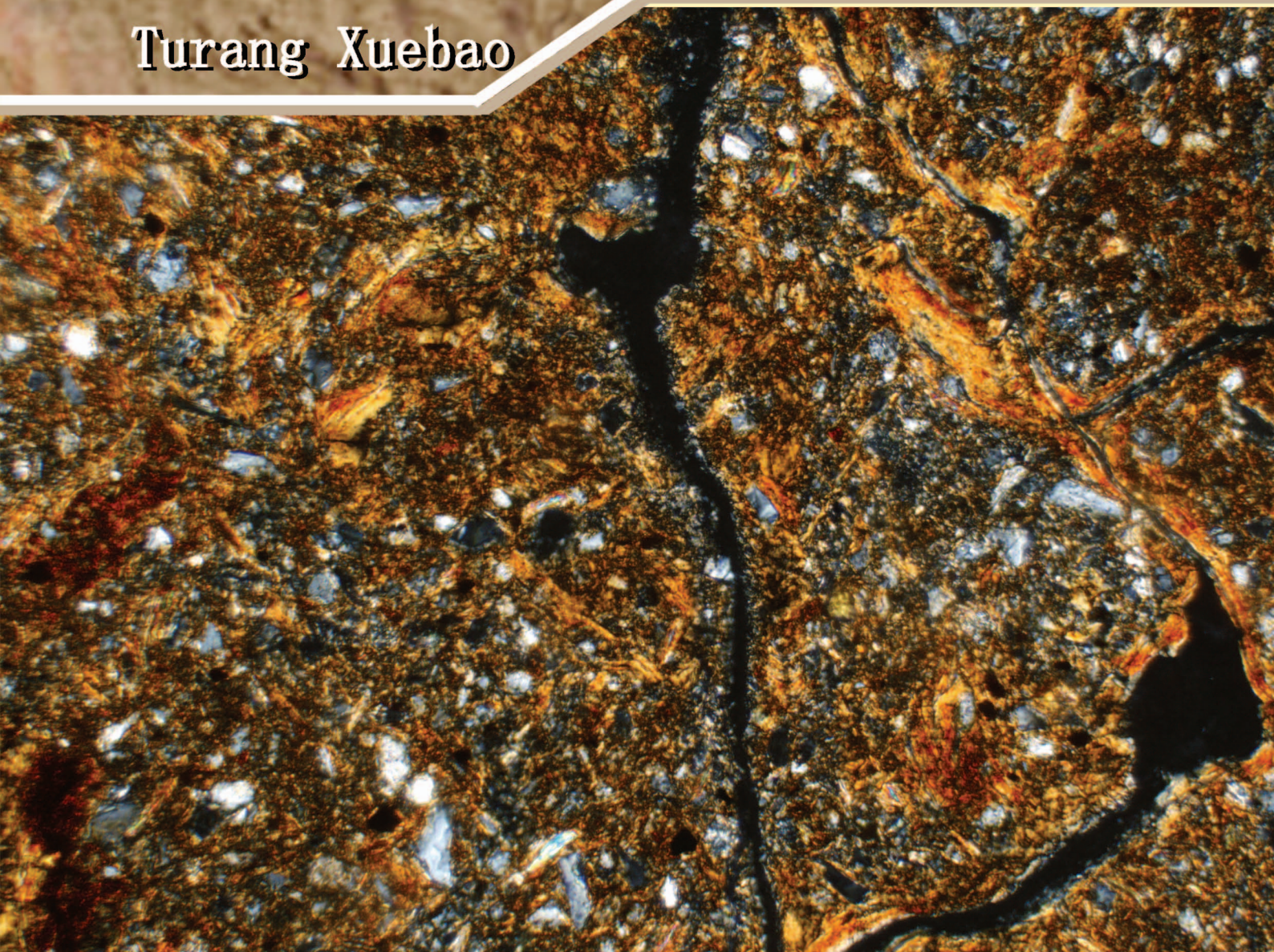


ISSN 0564-3929

Acta Pedologica Sinica 土壤学报

Turang Xuebao



中国土壤学会 主办
科学出版社 出版

2015

第 52 卷 第 2 期

Vol.52 No.2

《土壤学报》编辑委员会

主 编: 史学正

执行编委: (按姓氏笔画为序)

丁维新	巨晓棠	王敬国	王朝辉	史 舟	宇万太	朱永官
李永涛	李芳柏	李保国	李 航	吴金水	沈其荣	张玉龙
张甘霖	张福锁	陈德明	邵明安	杨劲松	杨明义	杨林章
林先贵	依艳丽	周东美	周健民	金继运	逢焕成	胡 锋
施卫明	骆永明	赵小敏	贾仲君	徐国华	徐明岗	徐建明
崔中利	常志州	黄巧云	章明奎	蒋 新	彭新华	雷 梅
窦 森	廖宗文	蔡祖聪	蔡崇法	潘根兴	魏朝富	

编辑部主任: 陈德明

责任编辑: 汪枏生 卢 萍 檀满枝

土 壤 学 报

Turang Xuebao

(双月刊, 1948年创刊)

第52卷 第2期 2015年3月

ACTA PEDOLOGICA SINICA

(Bimonthly, Started in 1948)

Vol. 52 No. 2 Mar., 2015

编 辑 《土壤学报》编辑委员会
地址: 南京市北京东路71号 邮政编码: 210008
电话: 025 - 86881237
E-mail: actapedo@issas.ac.cn

主 编 史学正
主 管 中国科学院
主 办 中国土壤学会
承 办 中国科学院南京土壤研究所

出 版 科 学 出 版 社
地址: 北京东黄城根北街16号 邮政编码: 100717

印刷装订 北京中科印刷有限公司
总 发 行 科 学 出 版 社
地址: 北京东黄城根北街16号 邮政编码: 100717
电话: 010 - 64017032
E-mail: journal@mail.sciencep.com

国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址: 北京399信箱 邮政编码: 100044

Edited by Editorial Board of Acta Pedologica Sinica
Add: 71 East Beijing Road, Nanjing 210008, China
Tel: 025 - 86881237
E-mail: actapedo@issas.ac.cn

Editor-in-Chief Shi Xuezheng
Superintended by Chinese Academy of Sciences
Sponsored by Soil Science Society of China
Undertaken by Institute of Soil Science,
Chinese Academy of Sciences

Published by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,
Beijing 100717, China

Printed by Beijing Zhongke Printing Limited Company
Distributed by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,
Beijing 100717, China
Tel: 010 - 64017032
E-mail: journal@mail.sciencep.com

Foreign China International Book Trading Corporation
Add: P. O. Box 399, Beijing 100044, China

国内统一刊号: CN 32-1119/P

国内邮发代号: 2-560

国外发行代号: BM45

定价: 60.00元

国 内 外 公 开 发 行



ISSN 0564-3929



9 770564 392156

DOI: 10.11766/trxb201402250081

模拟条件下土壤硝化作用及硝化微生物对 不同水分梯度的响应*

刘若萱^{1,2} 张丽梅¹ 白 刃^{1,2} 贺纪正^{1†}

(1 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

(2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要 以江苏滨海县一植稻土壤为研究对象, 在微宇宙培养条件下设置了不同水分处理(最大持水量的 30%、60%、90% 和淹水 2 cm 深), 研究了硝化作用及硝化微生物对水分变化的响应特征。结果表明: 淹水处理显著降低了土壤的氧化还原电位(E_h), 但所有处理土壤 E_h 变化范围为 330 ~ 500 mV, 土壤整体处于氧化态。在每 7 天向土壤加入 $10 \text{ mg kg}^{-1} \text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的连续培养过程中, 各个水分处理均观察到明显的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 降低和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 累积的现象, 60% WHC 处理下土壤硝态氮累积最显著和迅速, 90% WHC 处理次之, 随培养时间延长, 30% WHC 和淹水处理也观察到明显的硝化作用。淹水处理中氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)的数量显著高于非淹水处理, 且淹水处理中 AOB 在 DGGE 图谱上的条带更加清晰明亮, 而氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)的群落组成和数量在不同水分处理间无明显变化。表明该土壤中 AOB 对水分条件变化响应灵敏, 是该土壤的硝化作用、尤其是淹水条件下硝化作用发生的主要原因。

关键词 水稻土; 水分; 氧化还原电位; 硝化作用; 氨氧化细菌; 氨氧化古菌

中图分类号 S152.7; S154.3 **文献标识码** A

水稻是我国重要的农作物, 不仅在农业生产中具有重要地位, 其生态效应也越来越受到关注。水稻田生态系统和全球氮循环过程息息相关, 水稻田中氮肥利用效率低及由于硝化-反硝化作用所产生的硝态氮淋失和 N_2O 释放等问题一直备受瞩目。由于频繁的干湿交替, 导致稻田土壤氧化还原电位的波动剧烈, 影响着微生物驱动的元素生物地球化学循环过程。硝化作用是一个由好气性微生物催化的好氧过程, 包括氨氧化和亚硝酸盐氧化两个步骤。一般认为, 土壤水分为最大田间持水量的 50%~70% 时是最适宜硝化作用的水分状态, 过干和淹水条件均不利于硝化作用发生^[1-3]。与旱地土壤相比, 水稻土中好氧和厌氧状态并存, 使土壤中微生物参与的氧化和还原过程得以同时进行, 并且一般认为稻田土壤存在自上而下的氧气浓度梯度以及水稻根系的泌氧作用, 同样有利于硝化作用的发生^[4]。

作为硝化作用的限速反应步骤, 氨氧化作用是

氮循环的中心环节, 过去一直被认为是由氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)所驱动, 直至 2004 年发现古菌中也存在 *amoA* 基因序列, 随后发现海洋和土壤中也存在大量氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA), 并证实了其在一些土壤的硝化作用中起着主导作用^[5-7]。大量有关氨氧化微生物多样性的调查研究表明: 土壤 pH、氮水平、施肥、温度、土壤类型、土壤养分和盐分含量等因素均可能影响氨氧化微生物的群落结构、组成及丰度^[8-10], 并且研究发现土壤 pH 和氮素水平是调节氨氧化细菌和氨氧化古菌功能活性及生态位分化的决定性因子^[11]。国内外研究者对不同水稻土中硝化过程以及 AOB 和 AOA 的多样性及其对施肥等环境因子的响应也做了部分研究, 发现种植水稻的土壤硝化作用强度以及 AOB 和 AOA 的数量明显高于不种植水稻的土壤, 且其群落结构组成也明显不同, 并发现淹水的水稻土中 AOB 和 AOA 的群落丰度和结构主要受土壤类型的影响^[12-15]。但这些研

* 国家自然科学基金项目(41090281, 41322007)资助

† 通讯作者, E-mail: jzhe@rcees.ac.cn

作者简介: 刘若萱(1988—), 女, 河北张家口人, 硕士研究生, 从事土壤分子生态学研究。E-mail: liuruoxuanll@mails.gueas.ac.cn

收稿日期: 2014-02-25; 收到修改稿日期: 2014-04-20

究较少考虑氨氧化微生物多样性变化与土壤原位硝化作用变化之间的关系。此外,水稻土干湿交替变化频繁,水分和氧气是影响水稻田土壤生物化学过程和微生物活性的关键因子,是水稻土氮循环研究的核心问题^[16-17]。然而目前大多数研究集中于不同干湿条件对稻田土壤氮矿化、 N_2O 释放或者硝化作用的影响^[18-21],但从微生物学机制出发,研究硝化微生物对不同水分条件变化的响应及其对硝化作用的影响并不多。本文通过室内微宇宙培养土壤,调控不同水分梯度来模拟水稻生产过程中的干湿条件,在监控土壤氧化还原电位(Eh)变化的基础上,运用 PCR-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)和定量 PCR 技术等研究氨氧化微生物的群落结构及种群数量变化,结合考察培养过程中水稻土硝化作用活性变化,以探讨不同干湿条件下该水稻土硝化作用过程发生的微生物机制,以期为认识水稻田土壤氮循环过程和为稻田土壤水分管理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品及实验处理

供试水稻土采自江苏省滨海县一水旱轮作农田土壤(东经 $119^{\circ}84'$,北纬 $34^{\circ}01'$),取土深度为 0~30 cm,土壤类型为河流冲积物发育的滨海盐碱土(砂粒 19.12%,粉粒 55.88%,黏粒 26.99%)。土壤为弱碱性,pH7.9,电导率 $EC\ 0.49\ dS\ m^{-1}$,热水可溶性有机碳(HWC)为 $184\ mg\ kg^{-1}$,取样时土壤含水量约为 24%,最大田间持水量为 40.3%。土样运回实验室后,过 2.0 mm 筛后存放于温室备用。

微宇宙培养实验所用容器为 250 ml 的玻璃广口瓶,实验共设置 4 个水分梯度处理:田间持水量(WHC)的 30%、60%、90% 及淹水状态(waterlogging),分别在第 7、15、30、60 天进行破坏性取样,每次取样下各处理均设置 4 个重复。实验过程如下:向每个广口瓶分别装入 50 g 土壤,通过向土壤中均匀地添加不同量的无菌水,调节土壤含水率至田间持水量(WHC)的 30%、60%、90% 以及淹水约 2 cm 深,并在调节水分梯度的同时加入终浓度为 $10\ mg\ kg^{-1}$ 的 NH_4^+-N (氯化铵),此后将 Eh 计的 Pt 电极插入土壤,以铝箔纸盖住瓶口,置于 $28^{\circ}C$ 培养。培养过程中通过每周补加水保持恒重,培养开始后每隔 7d 再次加入 $10\ mg\ kg^{-1}$ 的 NH_4^+-N ,如遇当天或第二天取样的处理则加等量无菌水替代氯化

铵溶液,以保证每次取样均在加氯化铵后 7d 进行。每次采样后,土样分为两份,一份经冷冻干燥后保存于 $-80^{\circ}C$ 冰箱用于 DNA 的提取,其余保存在 $4^{\circ}C$ 冰箱用于基本理化性质的测定。

1.2 项目分析与测定

土壤 Eh 的测定采用 PRN-41 便携式土壤 Eh 计(DKK,TOA,Tokyo,Japan),样品培养过程中测量电极 Pt 电极一直插于土壤中,测量时将参比电极靠近测量电极附近,插入土壤约 2 cm 深的位置进行读数。每次测定时通过在不同方位移动参比电极读取 3~4 个读数取其平均值作为 Eh 读数。

土壤 NH_4^+-N 、 $NO_3^- -N$ 以 $1\ mol\ L^{-1}$ KCl 溶液提取(土水比 1:5), $200\ r\ min^{-1}$ 条件下振荡 1h,离心,过滤,用连续流动分析仪(SAN++,Skalar,Holland)测定。

土壤总 DNA 提取采用 PowerSoil™ Total DNA Isolation 试剂盒进行(MO BIO laboratories,CA,USA),称取 0.25 g 经冷冻干燥的样品,按试剂盒提供的操作步骤进行,以 FastPrep® 细胞破碎仪(Qbio-gene Inc.,USA)进行细胞破碎处理,速度 $5.0\ m\ s^{-1}$,时间 45 s。提取的 DNA 在 1% 的琼脂糖胶中进行电泳检测。

定量 PCR 分析:氨氧化细菌和氨氧化古菌 *amoA* 基因的定量分析采用 SYBR GREEN 法,引物分别为 *amoA1F/amoA2R*^[22] 和 *CrenamoA23f/CrenamoA616r*^[23]。定量所使用的试剂为 SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa,Japan), $25\ \mu l$ 反应体系中包括 $2 \times$ SYBR Premix Ex Taq™ $12.5\ \mu l$,引物(浓度为 $10\ \mu mol\ L^{-1}$)各 $0.5\ \mu l$,5 倍稀释的模板 DNA $2\ \mu l$ 。Real-time PCR 反应在 BioRadIQ5 上运行,氨氧化细菌和氨氧化古菌 *amoA* 基因的退火温度均为 $55^{\circ}C$,扩增分别采用 35 和 40 个循环,在 $83^{\circ}C$ 收集反应荧光信号,数据分析采用 iCycler 软件。

变性梯度凝胶电泳分析:对氨氧化细菌和氨氧化古菌 *amoA* 基因的变性梯度凝胶电泳分析(PCR-DGGE)分别以引物 *amoA1F-GC/amoA2R* 和 *CrenamoA23f/CrenamoA616r*^[6] 进行 PCR 扩增。 $50\ \mu l$ 的 PCR 反应体系中包括 $2 \times$ Premix Ex Taq™ $25\ \mu l$,引物(浓度为 $10\ \mu mol\ L^{-1}$)各 $1\ \mu l$,5 倍稀释的模板 DNA $4\ \mu l$ 。氨氧化古菌 *amoA* 基因的扩增程序为: $95^{\circ}C\ 5\ min$; $94^{\circ}C\ 30\ s$, $55^{\circ}C\ 30\ s$, $72^{\circ}C\ 1\ min$ (10 个循环); $92^{\circ}C\ 30\ s$, $55^{\circ}C\ 30\ s$, $72^{\circ}C\ 1\ min$ (25 个循环); $72^{\circ}C$ 延伸 $10\ min$ ^[6]。氨氧化细菌 *amoA* 基因扩增采用 touchdown 程序,退火温度在前 10 个循环每个循

环降 0.5℃ (62℃ ~ 57℃), 后 30 个循环为 57℃, 其余与氨氧化古菌相同。DGGE 采用的丙烯酰胺胶浓度为 6%, 氨氧化细菌 *amoA* 基因所用的变性胶浓度梯度范围为 45%~65%, 氨氧化古菌为 10%~45%。氨氧化细菌和氨氧化古菌电泳条件分别为 120V、8h 和 90V、12h。电泳结束后, 卸下胶板, 用含 0.1 μg ml⁻¹ EB 的 TAE 溶液避光染色 30 min, 然后用去离子水漂洗 10 min, 以 Bio-Rad Gel DOC™ XR + 凝胶成像系统拍照并分析。由于样品量较大, 各处理仅随机挑选了 2 个重复进行 DGGE 电泳。

1.3 数据处理

定量 PCR 得到的基因拷贝数经过对数转换后进行统计分析。作图分析在 Origin8 中完成, 差异显著性检测采用单因素方差分析 (S-N-K 检验, $p < 0.05$), 在 SPSS16.0 软件中进行。

2 结果

2.1 不同水分梯度下土壤 *Eh* 的变化

整个培养过程中, 土壤 *Eh* 在 330 ~ 500 mV 的范围内变化。培养前期 (7d 时), 90% WHC 处理 (约 392 mV) 显著低于 60% WHC (约 429 mV) 和 30% WHC (约 424 mV) 处理, 淹水处理土壤的 *Eh* (约 336 mV) 显著低于非淹水处理。随着培养时间的延长, 各水分处理的土壤 *Eh* 均有不同程度的增加, 从培养 15d 至培养结束时, 除淹水处理外, 其余各水分梯度处理土壤 *Eh* 在 449 ~ 498 mV 间变化, 且无明显差异。淹水处理土壤 *Eh* 在 15 d 前无明显变化, 培养至 30d 时增加至约 376 mV, 并在培养后期进一步增加至 468 mV。

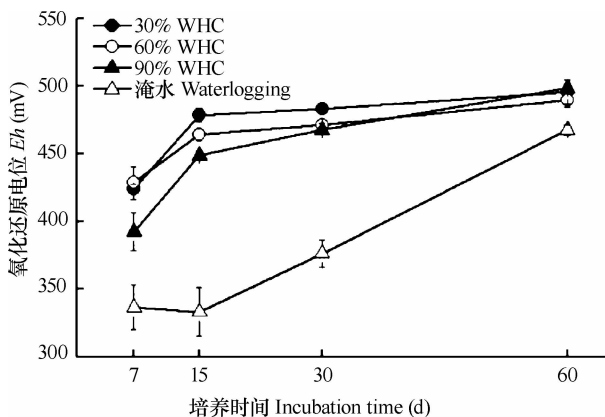


图 1 培养过程中土壤 *Eh* 的变化

Fig. 1 Dynamic of soil *Eh* during microcosm incubation

2.2 不同水分梯度下土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的变化

培养过程中不同水分处理下土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的变化如图 2 和图 3 所示。由于在每次取样前 7d, 均向土壤加了 10 mg kg⁻¹ 的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$, 在培养前期 (7d 时), 铵态氮表现出一定积累, 随后铵态氮含量显著下降, 并一直处于较低的水平, 小于 5 mg kg⁻¹。除在第 7 天取样时, 30% WHC 和淹水处理土壤中铵态氮含量显著地高于其他处理外, 不同水分处理之间无显著差异。与铵态氮变化趋势相反, 随培养时间增加, 各个水分处理均出现了明显的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 累积, 其中以 60% WHC 处理的累积最为显著和快速, 90% WHC 处理次之。除小幅波动外, 不同取样时间下, 60% WHC 和 90% WHC 处理土壤中硝态氮含量均较其他处理高, 在培养 7d 至 60d 时, 分别从 16.30 和 17.15 mg kg⁻¹ 增加至 102.8 和 109.1 mg kg⁻¹。培养初期 (7d 时), 淹水处理土样几乎检测不到硝态氮, 但随培养时间延长, 硝态氮含量从 22.46 mg kg⁻¹ 增加至 82.87 mg kg⁻¹。30% WHC 处理在 7、15、30d 取样时硝态氮累积较少 (0.55 ~ 11.71 mg kg⁻¹), 但在培养后期明显增加, 在 60d 时浓度达 83.85 mg kg⁻¹。在整个培养过程中, 最后一次取样的样品 (第 60 天) 共加入 8 次铵态氮, 累计约 80 mg kg⁻¹, 从 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的变化曲线上可以看出其整个培养过程中增加量约为 80 mg kg⁻¹, 可见整个过程中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 几乎完全转化为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$, 表明在不同水分处理下, 土壤中均发生了强烈的硝化作用。对比 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的变化趋势, 其中 30% WHC 和淹水处理土壤的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 要明显高于 60% WHC 和 90% WHC 处理, 而 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 前两者要明显地低于后两者, 表明 60% WHC 和 90% WHC 处理较 30% WHC 和淹水处理更有利于硝化作用的发生。

2.3 不同水分梯度下土壤氨氧化细菌和氨氧化古菌群落丰度的变化

在各个取样时间下, 氨氧化细菌 (AOB) 的数量在淹水处理中显著增加, 且在培养 15d 后较 7d 时明显增加, 而在其他水分处理间及不同培养时间点中无显著差异 (图 4)。所有处理中, 氨氧化古菌 (AOA) 的数量在培养 15 d 后显著下降 (图 5)。此外, 除在 7 d 时 30% WHC 处理 AOA 丰度显著小于其他 3 个水分处理, 15 d 时 60% WHC 处理 AOA 丰度显著小于其他 3 个水分处理外, 同一取样时间点不同水分处理间均无显著差异 (图 5)。表明该土壤中氨氧化古菌对不同水分梯度无明显响应。

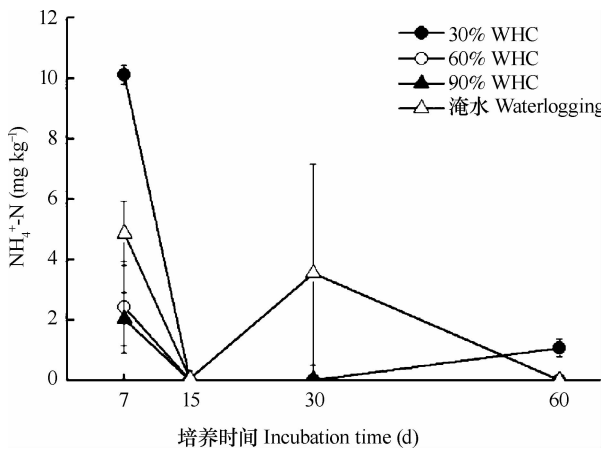


图 2 各个取样时间土壤 NH₄⁺-N 含量变化

Fig. 2 NH₄⁺-N concentration in soil during microcosm incubation

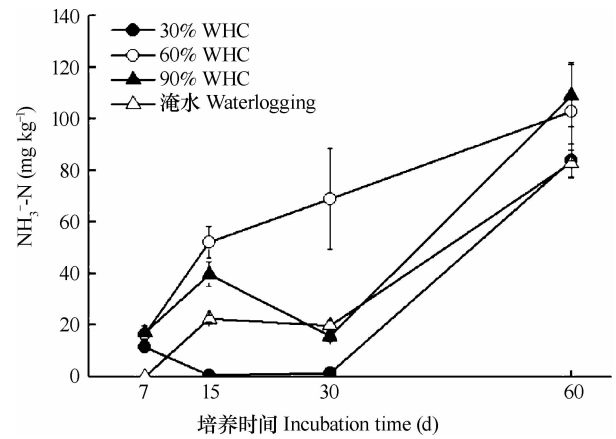


图 3 各个取样时间土壤 NO₃⁻-N 含量变化

Fig. 3 NO₃⁻-N concentration in soil during microcosm incubation

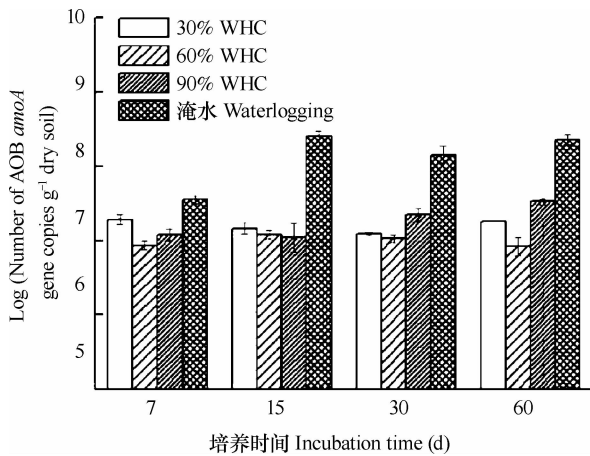


图 4 氨氧化细菌 *amoA* 基因拷贝数

Fig. 4 Number of bacterial *amoA* gene copies

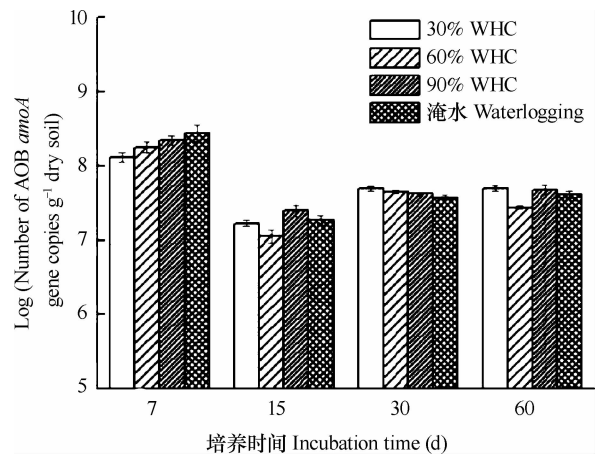


图 5 氨氧化古菌 *amoA* 基因拷贝数

Fig. 5 Number of archaeal *amoA* gene copies

2.4 不同水分梯度下土壤氨氧化细菌和氨氧化古菌群落结构的变化

DGGE 分析显示 AOB 的群落组成在淹水处理后发生明显变化,在培养至 7d 和 15d 时,淹水处理的 DGGE 条带更清晰明亮,并在培养后期(30d 和 60d)条带明显增多,非淹水的 3 个处理在不同的取样时间和处理间无显著差异(图 6a)。AOA 的 DGGE 图谱除在培养 7d 后 AOA 群落个别条带(由虚线框标出的)明显减少外无显著变化,各水分处理间也无显著差异(图 6b)。

3 讨论

3.1 土壤水分变化对硝化作用和 *Eh* 的影响

硝化作用是微生物的好氧化过程,多数大田实验和室内模拟研究显示,在田间持水量的 50%~

60% 时,土壤硝化作用最为活跃,这个水分范围既满足了微生物代谢活动的最佳水分条件,也满足了氧气扩散的条件^[24-25]。本研究也发现,在所有水分梯度处理中,60% WHC 处理下土壤硝态氮积累最显著和迅速,几乎呈线性方式积累。此外,90% WHC 处理土壤也表现出较强的硝化作用。同时,我们还观察到随着培养时间的延长,30% WHC 处理在培养 30 d 后和淹水处理在培养 7 d 后也表现出明显的铵态氮消耗,并伴随着硝态氮积累,在培养 60d 时对铵的转化效率接近 100%。此前也有研究报道,在一些土壤中,在饱和持水量或淹水条件下土壤硝化作用最强,因土壤类型而异^[24-26]。如钱琛和蔡祖聪^[2]发现红壤在加铵处理的情况下,硝化速率随着水分的增加而递增,因此人们认为在保证一定的 O₂ 供应的情况下,足够的水分反而促进底物扩散更有利于硝化作用的发生。

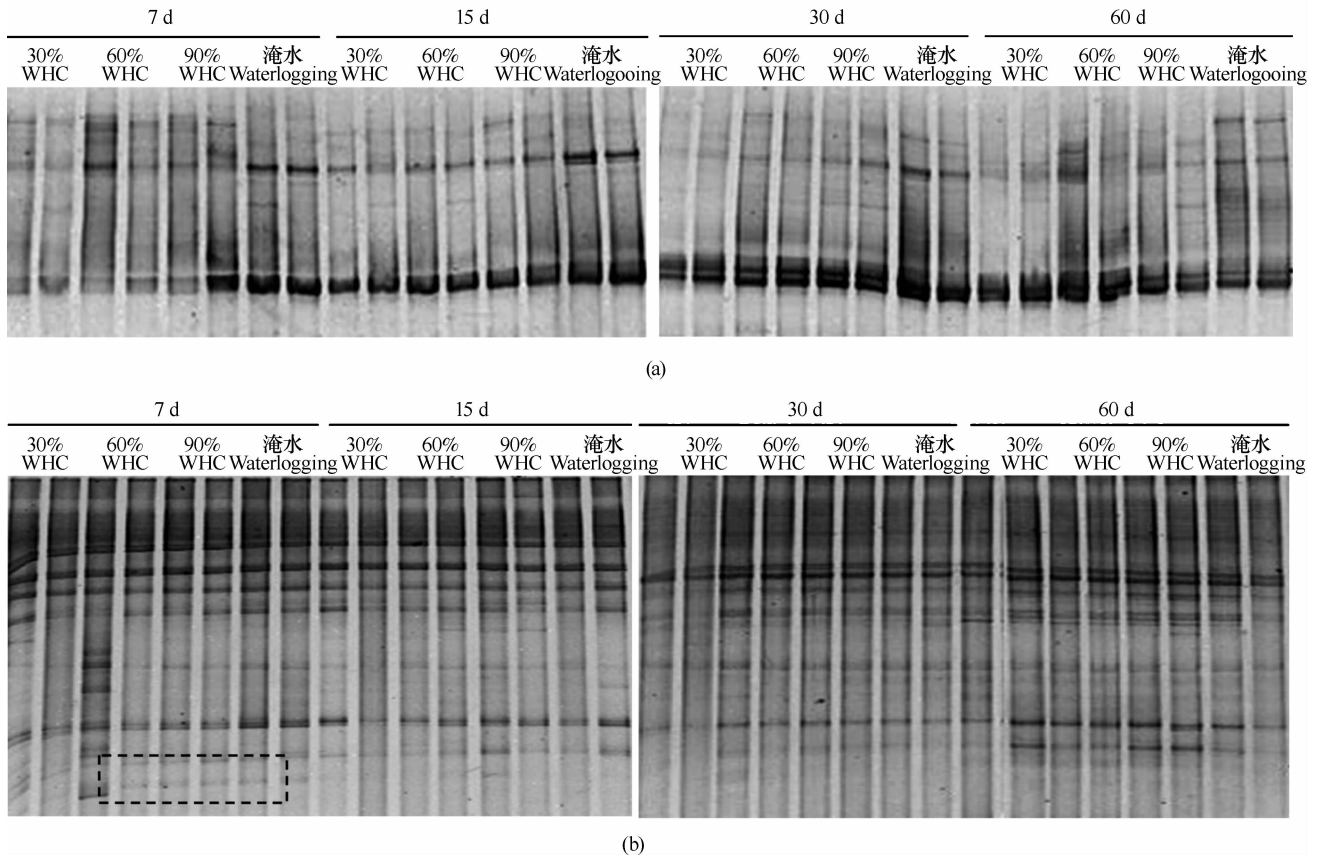


图6 不同水分梯度处理下 AOB(a) 和 AOA(b) 的 DGGE 图谱

Fig. 6 DGGE profiles of AOB (a) and AOA (b) *amoA* gene in soil during microcosm incubation

在整个培养过程中,本研究中土壤 Eh 变化范围为 330 ~ 500 mV。丁昌璞^[27]对我国不同土壤氧化还原电位研究发现,即使水稻土壤明显区别于旱地土壤的特征是其以还原过程为主,但水稻土也可分为氧化性、氧化还原性和还原性三种类型。虽然本研究中供试土壤淹水处理后 Eh 显著低于非淹水处理,但 Eh 均在 330 mV 以上,并在培养后期增加,表明总体来说该土壤是属于氧化性水稻土壤,即使在水分饱和的情况下,也能满足硝化作用需要的氧化条件。

此外,理论上土壤 Eh 应随土壤水分含量增加而降低,但在研究中除培养初期(7d 时),90% WHC 处理土壤 Eh 明显低于 30% WHC 和 60% WHC 外,3 个非淹水处理间 Eh 变化并不明显,这可能是由于水分含量较高的处理土壤在培养过程中,土壤聚集成团,使得氧气随空隙扩散,进而导致 Eh 测量值较理论值偏高。另一方面, Eh 监测结果显示在培养至 60d 时,淹水处理土壤 Eh 也明显增加,可能由于培养瓶在长时间静置后,空气中的氧气进一步溶解扩散,以及还原性物质得以被氧化所致。此外,培养

过程中 Eh 计的铂电极长期埋于土壤中,也可能导致电极钝化从而影响了测量的准确性,同时每周进行的恒湿加水和加氮操作也可能对 Eh 产生一定的影响。但本研究的主要结果趋势在前 3 次取样时已经体现出来了,此误差并不影响研究的主要结论。

3.2 土壤水分对氨氧化微生物的影响

本研究发现,淹水处理 7d 后显著增加了 AOB 的数量,DGGE 分析结果也显示淹水处理中 AOB 的 DGGE 条带亮度明显增加,而 AOA 的群落组成和丰度在不同水分处理之间无显著变化,这些结果表明该土壤中氨氧化细菌对土壤水分增加产生积极响应,是本研究所观察到活跃的土壤硝化作用发生的主要推动力。本研究所用供试土壤 pH 约为 8,偏碱性,这之前我国学者通过利用稳定性同位素探测技术(SIP)证实的 AOB 在碱性土壤硝化作用中起主导作用的结果一致^[28]。所有水分处理在培养 15d 后,AOA 的数量明显降低,可能由于连续加氮抑制了 AOA 的生长所致。已有研究发现 AOA 对铵的亲合力显著高于 AOB,对底物浓度的要求小于 AOB^[9],高浓度的铵可能抑制 AOA 的生长。此外,

一些研究也报道 AOB 对水分变化的响应较 AOA 灵敏,与本研究的结果一致。如 Ke 和 Lu^[22]通过对北京和杭州的水稻土进行施肥和淹水处理后进行培养,也发现在加氮处理淹水培养后 AOB 的数量增加,群落组成发生变化,而 AOA 无明显变化。Gleeson 等^[29]研究了不同水分对澳大利亚西部半干旱土壤硝化作用的影响,发现当水分含量在 75%~95% WFPS(土壤孔隙含水量)之间时,土壤总硝化率和硝化活性随着水分的增加而显著降低,AOB 的 *amoA* 基因丰度随水分增加先增加后降低。

但也有研究报道一些土壤中 AOA 对水分的响应较 AOB 灵敏,如 Bustamante 等^[23]对智利半干旱土壤进行培养研究发现,当每 14 天向土壤中添加水分至 60% WHC 时,土壤中硝态氮浓度和净硝化率显著增加,AOA 的群落丰度也显著增加。Szukics 等^[30-31]的研究也发现,一些土壤中 AOA 对水分响应灵敏,但 AOA 的丰度在水分较高的土壤(70% WFPS)显著高于水分较低的土壤(40% WFPS)处理,而 AOB 受水分变化的影响较小,而更易受施氮的影响。这些研究结果表明不同氨氧化微生物类群对水分条件和氧气的要求不同,不同类型土壤因含有的硝化微生物类群不同,而表现出对水分的不同响应。

本研究淹水处理中 AOB 数量显著增加,表明这部分氨氧化细菌类群具有耐低氧条件的特性,使得其在本不利于硝化作用发生的淹水环境下仍然发挥作用。此外,培养后期 *Eh* 显著增加,这也更有利于硝化作用的发生。

4 结 论

综上所述,江苏滨海县这一黏质盐碱土壤在不同水分条件下均表现出较强的硝化活性,其中 60% WHC 和 90% WHC 处理土壤硝化活性明显强于 30% WHC 和淹水处理,说明适量的水分可以促进水稻土中硝化过程的进行。培养过程中淹水处理中 AOB 基因丰度显著高于非淹水处理,在 DGGE 图谱上 AOB 条带亮度较非淹水处理明显增强,而 AOA 的群落组成和数量在不同水分处理之间无明显变化,说明该土壤中 AOB 对水分变化响应灵敏,在该水稻土的硝化作用,尤其是在淹水条件下的硝化作用过程中起了主导作用。

参 考 文 献

- [1] 贾方亮,李忠佩,刘明,等. 氮素浓度和水分对水稻土硝化作用和微生物特性的影响. 中国生态农业学报, 2012, 20(9): 1113—1118. Jia F L, Li Z P, Liu M, et al. Effects of different concentrations of nitrogen and soil moistures on paddy soil nitrification and microbial characteristics (In Chinese). Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2012, 20(9): 1113—1118
- [2] 钱琛,蔡祖聪. 利用方式对红壤硝化作用的水分效应的影响. 环境科学, 2010, 31(10): 2417—2422. Qian C, Cai Z C. Influence of land-use type on moisture-effect of nitrification in subtropical red soils (In Chinese). Environmental Science, 2010, 31(10): 2417—2422
- [3] 张树兰,杨学云,吕殿青,等. 温度、水分及不同氮源对土壤硝化作用的影响. 生态学报, 2002, 22(12): 2147—2153. Zhang S L, Yang X Y, Lü D Q, et al. Effect of soil moisture, temperature and different nitrogen fertilizers on nitrification (In Chinese). ActaEcologicaSinica, 2002, 22(12): 2147—2153
- [4] Liesack W, Schnell S, Revsbech N P. Microbiology of flooded rice paddies. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(5): 625—645
- [5] 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
- [6] Zhang L M, Offre P R, He J Z, et al. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(40): 17240—17245
- [7] 贺纪正,张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展. 生态学报, 2009, 29(1): 406—415. He J Z, Zhang L M. Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle (In Chinese). ActaEcologicaSinica, 2009, 29(1): 406—415
- [8] Erguder T H, Boon N, Wittebolle L, et al. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(5): 855—869
- [9] Zhalnina K, de Quadros P D, Camargo F A, et al. Drivers of archaeal ammonia-oxidizing communities in soil. Frontiers in Microbiology, 2012, DOI: 10.3389/fmicb.2012.00210
- [10] 孙志高,刘景双. 湿地土壤的硝化-反硝化作用及影响因素. 土壤通报, 2008, 39(6): 1462—1467. Sun Z G, Liu J S. Nitrification-denitrification and its affecting factors in wetland soil—A review (In Chinese). Chinese Journal of Soil Science, 2008, 39(6): 1462—1467
- [11] Prosser J I, Nicol G W. Archaeal and bacterial ammonia-oxidizers in soil: The quest for niche specialisation and differentiation. Trends in Microbiology, 2012, 20(11): 523—531
- [12] 李奕林,王兴祥. 红壤区不同肥力水稻土根际硝化作用特征. 土壤学报, 2012, 49(5): 962—970. Li Y L, Wang X X. Nitrification in rhizosphere of rice in paddy soils different in fertility in red soil regions of subtropical China (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2012, 49(5): 962—970
- [13] Wang Y N, Ke X B, Wu L Q, et al. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rice field soil as affect-

- ed by nitrogen fertilization. *Systematic Applied Microbiology*, 2009, 32(1): 27—36
- [14] Chen X, Zhang L M, Shen J P, et al. Soil type determines the abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in flooded paddy soils. *Journal of Soils and Sediments*, 2010, 10(8): 1510—1516
- [15] Chen X P, Zhu Y G, Xia Y, et al. Ammonia-oxidizing archaea: Important players in paddy rhizosphere soil? *Environmental Microbiology*, 2008, 10(8): 1978—1987
- [16] Ludemann H, Arth I, Liesack W. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2): 754—762
- [17] Zheng X H, Wang M X, Wang Y S, et al. Impacts of soil moisture on nitrous oxide emission from croplands: A case study on the rice-based agro-ecosystem in Southeast China. *Chemosphere-Global Change Science*, 2000, 2(2): 207—224
- [18] Bateman E J, Baggs E M. Contributions of nitrification and denitrification to N₂O emissions from soils at different water-filled pore space. *Biology and Fertility of Soils*, 2005, 41(6): 379—388
- [19] Borken W, Matzner E. Reappraisal of drying and wetting effects on C and N mineralization and fluxes in soils. *Global Change Biology*, 2009, 15(4): 808—824
- [20] Liu W X, Zhang Z, Wan S Q. Predominant role of water in regulating soil and microbial respiration and their responses to climate change in a semiarid grassland. *Global Change Biology*, 2009, 15(1): 184—195
- [21] Tiemann L K, Billings S A. Tracking C and N flows through microbial biomass with increased soil moisture variability. *Soil Biology & Biochemistry*, 2012, 49: 11—22
- [22] Ke X B, Lu Y H. Adaptation of ammonia-oxidizing microorganisms to environment shift of paddy field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 80(1): 87—97
- [23] Bustamante M, Verdejo V, Zúñiga C, et al. Comparison of water availability effect on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in microcosms of a Chilean semiarid soil. *Frontier in Microbiology*, 2012, DOI: 10.3389/fmicb.2012.00282
- [24] Linn D M, Doran J W. Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and nontilled soils. *Soil Science Society of America Journal*, 1984, 48(6): 1267—1272
- [25] Skopp J, Jawsom M D, Doran J W. Steady-state aerobic microbial activity as a function of soil water content. *Soil Science Society of America Journal*, 1990, 54(6): 1619—1625
- [26] 孙波, 郑宪清, 胡锋, 等. 水热条件与土壤性质对农田土壤硝化作用的影响. *环境科学*, 2009, 30(1): 206—213. Sun B, Zheng X Q, Hu F, et al. Effect of temperature, rainfall and soil properties on farmland soil nitrification (In Chinese). *Environmental Science*, 2009, 30(1): 206—213
- [27] 丁昌璞. 中国自然土壤、旱作土壤、水稻土的氧化还原状况和特点. *土壤学报*, 2008, 45(1): 66—75. Ding C P. Oxidation-reduction regimes and characteristics of natural soil, upland soil and paddy soil in China (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(1): 66—75
- [28] Jia Z J, Conrad R. Bacteria rather than archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1658—1671
- [29] Gleeson D B, Müller C, Banerjee S, et al. Response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to changing water filled pore space. *Soil Biology & Biochemistry*, 2010, 42(10): 1888—1891
- [30] Szukics U, Abell G C, Hödl V, et al. Nitrifiers and denitrifiers respond rapidly to changed moisture and increasing temperature in a pristine forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72(3): 395—406
- [31] Szukics U, Hackl E, Zechmeister-Boltenstern S, et al. Rapid and dissimilar response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to nitrogen and water amendment in two temperate forest soils. *Microbiological Research*, 2012, 167(2): 103—109

RESPONSE OF NITRIFICATION AND NITRIFIER TO CHANGE IN SOIL MOISTURE CONTENT UNDER SIMULATED CONDITIONS

Liu Ruoxuan^{1,2} Zhang Limei¹ Bai Ren^{1,2} He Jizheng^{1†}

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

(2 *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

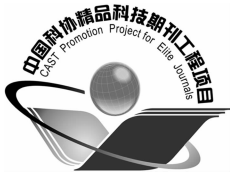
Abstract As rice is one of the most important crops in the world, paddy ecosystems have attracted worldwide attention because of their importance in food supply and their eco-functions as wetland. In paddy fields, frequent alternation of wetting and drying required in rice production leads to drastic fluctuation of soil redox potential, thus affecting various microbe-driven aerobic and anaerobic biogeochemical element recycling processes in the soil, including respiration nitrification and denitrification etc. Since the 1980s, excessive application of chemical fertilizers in various paddy field system management practices in China has brought about a series of environmental consequences, and most of the relevant re-

search efforts in the country have been focused on emission of N_2O , nitrification and denitrification, nevertheless, little is known about the underlying microbiological mechanism. Nitrification is an aerobic microbe catalyzed aerobic process, consisting of two steps, i. e. ammonia oxidation and nitrite oxidation. Ammonia oxidation, the rate-limiting step, is mainly catalyzed by ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and recently discovered ammonia-oxidizing archaea (AOA). It is generally held that soil moisture ranging between 50% and 70% of water holding capacity (WHC) is the most suitable moisture condition for nitrification, and soils, too dry or too wet, are unfavorable to nitrification. Compared with upland soil, paddy soil is subjected to frequent alternation of drying and wetting, which leads to drastic fluctuation of soil redox potential, thus affecting microbe-driven biogeochemical element recycling processes and metabolic activity and functional succession of soil microbes. Being the major factors affecting soil redox potential, moisture and oxygen therefore become the key factors in the study on nitrogen recycling in paddy soil.

To investigate responses of nitrification and nitrifying microbes to change in soil moisture and their underlying microbiological mechanisms, soil sample was collected from a paddy field of alkaline paddy soil, typical of Binhai County, Jiangsu Province, and soil microcosm experiments were set up with 4 moisture gradients including 30% WHC (Treatment 1), 60% WHC (Treatment 2), 90% WHC (Treatment 3), and 2 cm of overlaying water (Treatment 4). Results show that soil *Eh* was significantly lowered in Treatment 4, and did not differ much between the other three treatments. It varied from 330 to 500 mV, in all the treatments, indicating that on the whole the soils in all the treatments remained in oxidation state that satisfied nitrification basically even under flooded conditions. During the 60-day incubation period, 10 mg kg^{-1} NH_4^+ -N was added into soil once every 7 days. Apparent decrease in concentration of NH_4^+ -N was observed in all the moisture treatments over time, accompanying rapid accumulation of NO_3^- -N, which was the most obvious and rapid in Treatment 2 (60% WHC) and then in Treatment 3 (90% WHC). Even though accumulation of NO_3^- -N was slow in Treatment 1 and Treatment 4, active nitrification was also observed with the incubation going on. Compared with Treatments 1, 2 and 3, Treatment 4 was much higher in abundance of ammonia oxidizing bacteria (AOB). The dominant AOB bands in DGGE profiles were more distinct and brighter in Treatment 4 than in the others, and the number of AOB bands in the DGGE profiles increased significantly in the late incubation period, that is, from 30 days to 60 days, while AOA (ammonia oxidizing archaea) did not differ much either in abundance or in community structure between the 4 treatments. In addition, AOA dropped sharply in abundance in all the treatments after 15 days of incubation, which may be attributed to the inhibitive effect of continuous nitrogen addition on AOA. All the above described findings indicate that different ammonia oxidizing microbes have different requirements for water and oxygen, and the AOB in this type of soil, being very sensitive to changes in soil moisture condition, are responsible for the nitrification in the tested soil, especially, in waterlogging conditions.

Key words Paddy soil; Moisture; Redox potential; Nitrification; Ammonia-oxidizing bacteria; Ammonia-oxidizing archaea

(责任编辑:卢 萍)



土壤学报

(Turang Xuebao)



第 52 卷 第 2 期 2015 年 3 月

目 次

综述与评论

- 理论施氮量的改进及验证——兼论确定作物氮肥推荐量的方法 巨晓棠(249)
- 森林土壤氧化亚氮排放对大气氮沉降增加的响应研究进展 方华军 程淑兰 于贵瑞等(262)

研究论文

- 商丹盆地黄土母质发育土壤的微形态特征及其诊断意义 庞奖励 黄春长 查小春等(272)
- 基于土壤氮素平衡的氮肥推荐方法——以水稻为例 宁运旺 张永春(281)
- 三峡库区紫色土的碎石分布特征 王小燕 王天魏 蔡崇法等(293)
- 黄土区坡耕地土壤结皮对入渗的影响 吴秋菊 吴 佳 王林华等(303)
- 基于局部加权回归的土壤全氮含量可见-近红外光谱反演 陈颂超 冯来磊 李 硕等(312)
- 五价砷在中国南方两类典型土壤中的迁移特征 李璐璐 张 华 周世伟等(321)
- 柠檬酸盐对黑云母表面溶解及微结构变化的影响 李继福 张文君 鲁剑巍等(329)
- 活化过硫酸钠氧化土壤对挥发性有机污染物吸附特性的影响 丁浩然 王 磊 龙 涛等(336)
- 退化喀斯特森林植被自然恢复中土壤有机碳 $\delta^{13}C$ 值特征 黄宗胜 喻理飞 符裕红等(345)
- 缓释复合肥对茄子产量和不同采果期品质的影响 王 菲 李银科 王正银等(355)
- 氮肥和秸秆施用对稻麦轮作体系下土壤剖面 N_2O 时空分布的影响 潘晓健 刘平丽 李 露等(364)
- 应用 ^{15}N 示踪法研究咸水滴灌棉田氮肥去向 张 文 周广威 闵 伟等(372)
- 中国南方基础工程建设中土壤生态修复技术体系与实践 徐国钢 程 睿 赖庆旺等(381)
- 黑土农田施加 AM 菌剂对大豆根际菌群结构的影响 宋福强 程 蛟 常 伟等(390)
- 自生固氮菌对土壤钾的活化作用 张 亮 袁 玲 黄建国(399)
- 长期保护性耕作对纤维素降解基因 *cbh 1* 多样性的影响 陈 坤 李传海 朱安宁等(406)
- 模拟条件下土壤硝化作用及硝化微生物对不同水分梯度的响应 刘若萱 张丽梅 白 刃等(415)
- 水力侵蚀影响下土壤有机碳和微生物数量动态变化特征 喻 为 李忠武 黄金权等(423)

研究简报

- 土壤制图中土壤类型配色模型构建与应用 徐爱国 张维理 张怀志等(431)
- 土壤专题图中采样点点位标识模型的构建 张怀志 张维理 徐爱国等(440)
- 非对称混合电解质体系中恒电荷颗粒表面与 Stern 电位的测定 樊会敏 赵 艳 刘新敏等(446)
- 植被重建下露天煤矿排土场边坡土壤碳储量变化 李俊超 党廷辉 薛 江等(453)
- 滨海盐渍化土壤理化性质与小麦生产间的关系 谢文军 张衍鹏 张 森等(461)

信息

- 第 20 届国际土壤与耕作研究组织大会 (414)
- 《土壤学报》2014 年度审稿专家名录 (467)

封面图片: 陕西丹凤盆地土壤黏化层典型微形态(由庞奖励提供)

CONTENTS

Reviews and Comments

- Improvement and validation of theoretical N rate (TNR)—Discussing the methods for N fertilizer recommendation Ju Xiaotang(261)
- Study on the responses of nitrous oxide emission to increased nitrogen deposition in forest soils; A review Fang Huajun, Cheng Shulan, Yu Guirui, et al. (270)

Research Articles

- Micromorphological features of soils derived from loess in Shangdan Basin and their significance in soil diagnosis Pang Jiangli, Huang Chunchang, Zha Xiaochun, et al. (279)
- Soil nitrogen balance based recommendation of nitrogen fertilization; A case study of rice ... Ning Yunwang, Zhang Yongchun(292)
- Spatial distribution of rock fragments in purple soil in Three Gorges Reservoir Area Wang Xiaoyan, Wang Tianwei, Cai Chongfa, et al. (301)
- Effects of soil crusts on infiltration in slope land in the Loess Area Wu Qiuju, Wu Jia, Wang Linhua, et al. (311)
- Vis-NIR spectral inversion for prediction of soil total nitrogen content in laboratory based on locally weighted regression Chen Songchao, Feng Lailei, Li Shuo, et al. (319)
- Migration of pentavalent antimony in two types of soils typical to South China Li Lulu, Zhang Hua, Zhou Shiwei, et al. (327)
- Effects of citrate dissolving surface and altering microstructure of biotite Li Jifu, Zhang Wenjun, Lu Jianwei, et al. (335)
- Effect of soil oxidation with reactivated sodium persulfate on sorption of volatile organic contaminants Ding Haoran, Wang Lei, Long Tao, et al. (343)
- Characteristics of $\delta^{13}\text{C}$ value of soil organic carbon under naturally restoring degenerative karst forest Huang Zongsheng, Yu Lifei, Fu Yuhong, et al. (353)
- Effects of slow-release compound fertilizer on yield and quality of eggplant relative to timing of harvest Wang Fei, Li Yinke, Wang Zhengyin, et al. (362)
- Spatial and temporal distributions of soil profile N_2O as affected by N fertilization and straw incorporation in the rice-wheat rotation system Pan Xiaojian, Liu Pingli, Li Lu, et al. (371)
- Fate of fertilizer N in saline water drip-irrigated cotton field using ^{15}N tracing method Zhang Wen, Zhou Guangwei, Min Wei, et al. (379)
- Soil ecology remediation technical system and its practice in infrastructure construction in South China Xu Guogang, Cheng Rui, Lai Qingwang, et al. (389)
- Impact of inoculation with AM fungi on microbial community structure in soybean rhizosphere in farmland of black soil Song Fuqiang, Cheng Jiao, Chang Wei, et al. (397)
- Mobilization of potassium in soils by *Azotobacter* Zhang Liang, Yuan Ling, Huang Jianguo(404)
- Effects of long-term conservation tillage on diversity of cellulose degradating gene *cbh I* in Fluvo-aquic soil Chen Kun, Li Chuanhai, Zhu Anning, et al. (413)
- Response of nitrification and nitrifier to change in soil moisture content under simulated conditions Liu Ruoxuan, Zhang Limei, Bai Ren, et al. (421)
- Dynamics of soil microbial population and organic carbon under water erosion Yu Wei, Li Zhongwu, Huang Jinquan, et al. (430)

Research Notes

- Construction of a color matching model for soil types and its application to soil mapping Xu Aiguo, Zhang Weili, Zhang Huaizhi, et al. (439)
- Development of soil sampling point labeing model for the matic soil maps Zhang Huaizhi, Zhang Weili, Xu Aiguo, et al. (445)
- Principle for determination of surface potential and Stern plane potential of constant charged particles in asymmetric mixed electrolyte solutions Fan Huimin, Zhao Yan, Liu Xinmin, et al. (452)
- Variability of soil organic carbon storage in dump slope of opencast coal mine under revegetation Li Junchao, Dang Tinghui, Xue Jiang, et al. (460)
- Relationships between soil physicochemical properties and wheat production in coastal saline soil Xie Wenjun, Zhang Yanpeng, Zhang Miao, et al. (466)

Cover Picture: Typical micromorphological photos in Horizon Bt of the soil profile in Danfeng Basin, Shaanxi Province, China (by Pang Jiangli)