

DOI: 10.11766/trxb202007140240

田美洁, 郭俊丽, 黎娟, 葛体达, 唐海明, 贺志理, 刘毅. 长期施肥对水稻土剖面氨氧化古菌和细菌丰度及组成的影响[J]. 土壤学报, 2022, 59 (1): 285–296.

TIAN Meijie, GUO Junli, LI Juan, GE Tida, TANG Haiming, HE Zhili, LIU Yi. The Effect of Long-term Fertilization on the Abundance and Composition of Ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in Paddy Soil Profiles[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59 (1): 285–296.

长期施肥对水稻土剖面氨氧化古菌和细菌丰度及组成的影响*

田美洁^{1, 2}, 郭俊丽³, 黎娟¹, 葛体达², 唐海明⁴, 贺志理¹,
刘毅^{2†}

(1. 湖南农业大学农学院, 长沙 410128; 2. 中国科学院亚热带农业生态研究所亚热带农业生态过程重点实验室, 长沙 410125; 3. 航天凯天环保科技股份有限公司, 长沙 410100; 4. 湖南省土壤肥料研究所, 长沙 410125)

摘要: 长期施肥影响稻田土壤理化性质和硝化微生物群落, 但长期施肥对稻田不同土层氨氧化古菌 (AOA) 和氨氧化细菌 (AOB) 群落结构的影响尚不明确。以湖南宁乡稻田不同施肥制度长期定位试验为平台, 选取不施肥 (CK)、施秸秆有机肥 (ST)、有机-无机肥配施 (OM) 和施全量化肥 (NPK) 4 个处理, 采用实时荧光定量 PCR 和 Illumina MiSeq 测序等技术, 系统分析稻田不同土层 (0~10、10~20、20~30 和 30~40 cm) 理化性质和 AOA、AOB 丰度及组成的变化。结果表明, ST、OM 和 NPK 处理显著提高各土层有机碳 (SOC)、全氮 (TN)、有效磷 (Olsen-P) 的含量及硝化势 (NP), 降低土壤 pH。各处理中 SOC、TN、碱解氮 (AHN) 和 Olsen-P 的含量及 NP 随土壤深度的增加而降低, pH 则表现出相反趋势。CK 处理土壤 AOB 丰度均高于 AOA 的丰度, ST、OM 和 NPK 处理促进 AOA 的生长, 三种施肥处理中各土层 AOA/AOB 在 0.77~31.28 之间, 表明 AOA 在硝化过程中具有潜在作用。长期施肥均显著富集 AOA 中的 *Nitrosocosmicus* 和 AOB 中的 *Nitrosolobus*。冗余分析 (RDA) 表明 AOA、AOB 的垂直分布特征受不同施肥措施和土层分化的影响, Olsen-P 和 pH 分别是驱动土壤 AOA 和 AOB 群落结构演替的核心因子。

关键词: 长期施肥; 水稻土; 垂直分布; 氨氧化古菌; 氨氧化细菌

中图分类号: S154.36 文献标志码: A

The Effect of Long-term Fertilization on the Abundance and Composition of Ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in Paddy Soil Profiles

TIAN Meijie^{1, 2}, GUO Junli³, LI Juan¹, GE Tida², TANG Haiming⁴, HE Zhili¹, LIU Yi^{2†}

(1. College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China; 3. Aerospace Kaitian

* 国家自然科学基金项目 (41771300, 41301274) 和国家重点研发计划项目 (2017YFD0800504) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 41771300 and 41301274) and the National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFD0800504)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: liuyi@isa.ac.cn

作者简介: 田美洁 (1996—), 女, 宁夏银川人, 硕士研究生, 主要从事稻田土壤微生物研究。E-mail: 839756993@qq.com

收稿日期: 2020-07-14; 收到修改稿日期: 2020-12-28; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2021-03-02

Environmental Technology Co., Ltd., Changsha 410100, China; 4. Hunan Soil and Fertilizer Institute, Changsha 410125, China)

Abstract: 【 Objective 】 Nitrification is a critical process of the nitrogen cycle which is driven by ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB). It has been observed that long-term fertilization affect soil properties and nitrifying microbial community in paddy soils. However, the effect of long-term fertilization on the community structure of AOA and AOB along the depth in paddy soils has been given little attention. 【 Method 】 From a long-term experiment on fertilization management of a paddy field in Ningxiang, Hunan Province, we selected four treatments; no fertilization (CK), straw organic fertilizer (ST), organic-inorganic fertilizer (OM), and inorganic fertilizer (NPK), and used real-time fluorescent quantitative PCR and Illumina MiSeq sequencing technology to analyze the soil properties, and abundance and composition of AOA and AOB in the soil layers (0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm, 30-40 cm). 【 Result 】 ST, OM and NPK treatments increased the contents of soil organic carbon, total nitrogen, available phosphorus and the nitrification potential in each soil layer, but decreased soil pH. The contents of soil organic carbon, total nitrogen, alkali hydrolyzable nitrogen, available phosphorus, and the nitrification potential decreased with an increase in soil depth, while the pH value showed an opposite trend. Importantly, NPK had a more significant effect on soil acidification (0-20 cm) compared to the other fertilizers. The AOB abundance in the control (no fertilization) treatment was higher than AOA abundance, with the ratio of AOB/AOA abundance in the range 9.24-29.19. Also, the application of fertilizers promoted the growth of AOA, with the AOA/AOB abundance ratio in the range 0.77-31.28. Long term application of fertilizers enriched the proportion of *Nitrosocosmicus* in AOA population and *Nitrosolobus* in AOB population. Redundancy analysis showed that available phosphorus and pH had a significant impact on the composition of AOA and AOB communities, with interpretive degrees of 31.5% and 46.7%, respectively. This indicated that available phosphorus and pH were the key factors driving the succession of AOA and AOB community structure. Additionally, the vertical distribution characteristics of AOA and AOB were affected by different fertilization measures and soil layers. 【 Conclusion 】 Long term fertilization can acidify paddy soil and change the main executor of ammonia oxidation in the nitrification process. Variations in carbon, nitrogen, phosphorus and pH along the paddy soil depth induced the observed changes in AOA and AOB abundance and community composition and then affected the nitrification ability of soil. This study can serve as a theoretical basis for improving nitrogen use efficiency and reducing greenhouse gas emission.

Key words: Long-term fertilization; Paddy soil; The vertical distribution; Ammonia-oxidizing archaea; Ammonia-oxidizing bacteria

硝化过程是全球氮素循环的关键过程之一^[1], 是指在微生物的参与下将氨氧化为硝酸的过程。氨氧化古菌 (ammonia-oxidizing archaea, AOA) 和氨氧化细菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 作为驱动土壤硝化作用两步过程中第一步 (也是限速步骤) 的关键微生物^[2], 其种群丰度或群落结构会受到土壤有机碳 (SOC)^[3]、pH^[4]和有效磷 (Olsen-P)^[5]等多种环境因子以及农业管理措施如施肥^[6]的影响。

长期施肥能从系统的角度阐明人为干扰对农田生态系统的反馈和适应, 揭示出氨氧化微生物对施肥的响应^[7]。有研究^[8]表明, 长期不施肥和单施有机肥均降低稻田土壤 (0~20 cm) 全氮 (TN) 含量和土壤 pH。罗培宇等^[9]探明长期施用有机肥显著提高棕壤耕层土壤 (0~20 cm) 养分含量及 AOA 和 AOB 的丰度, 且有机肥处理下的土壤理化因子含量均高于不施肥和单施化肥处理。徐白璐等^[10]指出长期施化

肥与有机肥均会显著提高酸性土壤 (0~15 cm) SOC 含量, 且 AOA 和 AOB 基因丰度受 SOC 含量和 pH 的影响。虽然长期施肥影响稻田土壤及氨氧化微生物的相关研究已有报道, 但大多研究均集中于耕作层 (0~20 cm) 土壤, 对长期施肥状态下水稻土理化因子及氨氧化微生物垂直分布特征的研究尚少。

土壤中的碳、氮和磷等是影响土壤肥力和植物生长发育的重要营养元素。大量研究表明, 土壤剖面的理化性质具有垂直梯度特征, 其中也包括因土壤剖面分化的氧化还原电位, 从而影响土壤的硝化作用^[11]。骆坤等^[12]对黑土进行长期施肥试验中发现, 有机肥施入下黑土表层 (0~20 cm) 和亚表层 (0~40 cm) SOC 和 TN 均有所提高。徐虎^[13]指出化肥配施有机肥显著提高了长期不施肥红壤、壤土、潮土和黑土 0~100 cm 土层的磷素含量。研究^[14]表明, 硝化作用主要发生在土壤 0~60 cm 的基质层。

然而, 杨靖民等^[15]发现黑土稻田土壤硝化速率在深层土壤剖面(60~80 cm)中仍可高达 $107.3 \mu\text{g} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ 。AOA 和 AOB 在土壤剖面中存在生态位差异。Tao 等^[16]发现在中国西北黄土高原土壤剖面中, AOB 在表层土壤(0~20 cm)中富集, AOA 在底土(20~40 cm 和 40~60 cm)中最为丰富, 且 AOB 和 AOA 对高氮的输入响应不同。长期水稻种植和不同施肥措施等导致土壤理化性质沿土壤剖面分化^[17], 但目前关于长期施肥如何影响不同土层 AOA 和 AOB 的研究仍待深入。

为进一步探究长期施肥对稻田不同土层氨氧化微生物种群丰度及组成的影响, 本试验依托湖南省宁乡市稻田不同施肥制度长期定位试验, 选取不施肥、施秸秆有机肥、施有机-无机肥以及施全量化肥四种施肥制度, 采集 0~10、10~20、20~30 和 30~40 cm 土层土壤样品, 运用荧光定量 PCR (qPCR) 和 Illumina MiSeq 测序技术, 系统分析长期施肥状态下稻田土壤氨氧化微生物沿土壤剖面丰度和组成的变化特征及其核心驱动因子。研究结果可为提高稻田氮素利用效率、温室气体减排提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 采样点与样品采集

土壤采样地点位于典型双季稻产区的湖南省宁乡市农业技术推广中心(112°18'E, 28°07'N), 海拔 36.1 m, 年平均气温为 16.8℃, 年均降水量为 1 554

mm, 年均无霜期 274 d, 年日照时长 1 663 h。于 1986 年设立田间试验, 为长期定位施肥实验田。

本研究采用 1 个对照和 3 个施肥处理: (1) 无肥对照(CK)处理: 不施加任何肥料; (2) 秸秆有机肥处理(ST): 施用上一年度晚稻收割的水稻秸秆, 秸秆还田量为 $2\ 775 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 其中 N、 P_2O_5 和 K_2O 的含量分别为 $18.04 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、 $3.61 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 和 $24.70 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 总氮磷钾量不足则用化肥补足; (3) 有机-无机肥处理(OM): 60%氮来源于有机肥(水稻秸秆), 40%氮来源于化肥; (4) 全量化肥处理(NPK): 仅施氮磷钾化肥, 总施 N、 P_2O_5 和 K_2O 的含量分别为 $142.5 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、 $54.0 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 和 $63.0 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。试验小区面积为 28.22 m^2 , 每个处理 3 次重复, 随机区组设计。每个处理采用五点法采集土壤后混合, 土壤剖面 0~40 cm 范围内按 10 cm 间距分段采样, 重复 3 次。土壤样品剔除石块及植物残茬后过 2 mm 筛, 将土样分为两份: 一份用锡箔纸包好立即用液氮速冻, 存放于 -80°C 冰箱, 用于分子生物学实验; 另一份土样取回后立即测定其理化指标及土壤硝化势。土壤的基本理化性质见表 1。

1.2 样品理化指标测定方法

土壤 pH 采用电位法按水土比 2.5:1 用 pH 计(Mettler-toledo320, 上海)测定; SOC 和 TN 参考《土壤农业化学分析方法》^[18]分别采用重铬酸钾容量法和半微量凯氏定氮法测定; Olsen-P 含量采用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 浸提—钼锑抗比色法测定; 碱解氮(AHN)采用 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 水解—碱解扩散法测定。

表 1 供试土壤基本理化性质

Table 1 Characteristics of the soil in this study

施肥处理 Fertilization treatment	土层深度 Soil depth/cm	黏粒 Clay/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	粉粒 Silt/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	砂粒 Sand/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	有机质 Organic matter/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
CK	0~10	65.7	716.3	218.0	18.32
	10~20	72.7	744.5	182.7	15.78
	20~30	114.1	751.1	134.8	6.48
	30~40	117.3	786.2	96.5	5.42
ST	0~10	60.0	669.9	270.1	22.04
	10~20	51.1	744.1	204.8	20.07
	20~30	92.7	799.6	107.8	11.90
OM	30~40	119.4	819.7	60.9	6.08
	0~10	52.8	691.6	255.6	25.46

续表

施肥处理 Fertilization treatment	土层深度 Soil depth/cm	黏粒 Clay/ (g·kg ⁻¹)	粉粒 Silt/ (g·kg ⁻¹)	砂粒 Sand/ (g·kg ⁻¹)	有机质 Organic matter/ (g·kg ⁻¹)
OM	10~20	54.4	679.0	266.7	24.89
	20~30	94.1	756.2	149.7	12.12
	30~40	130.5	827.1	42.4	5.89
	0~10	64.3	738.0	197.6	17.48
NPK	10~20	67.9	760.2	171.9	16.13
	20~30	100.2	775.1	124.7	9.40
	30~40	129.9	823.0	47.2	6.09

注: CK: 无肥对照处理; ST: 秸秆有机肥处理; OM: 有机-无机肥处理; NPK: 全量化肥处理。下同。Note: CK: no fertilizer treatment; ST: straw organic fertilizer treatment; OM: organic-inorganic fertilizer treatment; NPK: inorganic fertilizer treatment. The same below.

1.3 硝化势的测定方法

土壤硝化势 (NP) 的测定采用好气培养法^[18]并稍作修改, 具体如下: 取新鲜土壤样品 (相当于 600 g 烘干土重) 按 100 mg·kg⁻¹ (以 N 计) 烘干土质量的比例加入硫酸铵并充分混匀, 调节土壤水分至田间持水量的 60%。称取 200 g 土样装入 250 mL 广口瓶中, 每个土样分装三瓶, 用扎孔的锡箔纸封口, 置于 25℃ 避光培养 4 周, 每周于每个广口瓶中取出 5 g 土壤, 用 1 mol·L⁻¹ KCl 浸提, 流动分析仪 (AA3 全自动连续流动分析仪, SEAL Analytical, 德国) 测定土壤 NO₃⁻-N 含量, 并定时向广口瓶中补充失去的水分。

1.4 土壤 DNA 的提取和实时荧光定量 PCR 分析

土壤 DNA 的提取采用 Fast DNA spin kit for soil (MP Biomedicals, Cleveland, OH, 美国) 试剂盒, 称取 0.5 g 经冷冻干燥的土样并按照试剂盒操作步骤进行。用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测提取 DNA 片段大小, 用 UV-Vis 分光光度计 (ND-1000, NanoDrop, 德国) 测定土壤 DNA 浓度及质量。

实时荧光定量 PCR (qPCR) 所用仪器为 ABI 7900 (Applied Biosystem, 美国), 对 AOB、AOA

基因进行 PCR 扩增, 具体片段见表 2。PCR 反应体系为 20 μL, 含 10 μL SYBR Premix Ex TaqTM, 上、下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 0.5 μL, 2 μL 10 倍稀释的 DNA 模板, 加灭菌水补至 20 μL。PCR 扩增程序为 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 34 s, 72℃ 延伸 32 s, 共 40 个循环, 最后于 72℃ 延伸 5 min。参考 Wang 等^[21]的方法并改进溶解曲线过程: 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 95℃ 15 s。

标准曲线采用导入氨氧化细菌或氨氧化古菌 *amoA* 功能基因的克隆子质粒制备。目的基因的克隆子接种于溶菌肉汤 (LB) 培养基中, 按照试剂盒 (E.Z.N.A.™ Plasmid Mini Kit) 说明书提取质粒、纯化质粒后, 测定质粒的浓度, 换算目的基因的拷贝数。最后 10 倍梯度稀释质粒制作定量 PCR 的标准曲线。AOB 和 AOA *amoA* 基因扩增效率分别为 94.3% ($R^2=0.999$) 和 96.6% ($R^2=0.998$)。

1.5 Illumina 测序和序列分析

PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 采用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒切胶回收, Tris_HCL 洗脱, 2% 琼脂糖电泳检测。将 PCR 产物送至上海

表 2 功能基因特异性引物序列

Table 2 Specific primers for functional gene used in this study

目标基因 Target gene	引物 Primers	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	参考文献 Reference
AOB <i>amoA</i>	<i>amoA</i> -1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	[19]
	<i>amoA</i> -2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	
AOA <i>amoA</i>	Arch- <i>amoA</i> F	STAATGGTCTGGCTTAGACG	[20]
	Arch- <i>amoA</i> R	GCGGCCATCCATCTGTATGT	

美吉生物医药科技有限公司进行 Illumina 测序, 测序得到的是双端序列数据, 每个样品至少获得 3 万条有效序列, 利用该公司生信云平台进行数据分析。采用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树, 建树方法为邻接法 (Neighbor-Joining), 重复抽样 (Bootstrap) 设为 1 000。

将优势操作分类单元 (OTUs) (>1%) 代表序列提交到 DNA 序列数据库 (GenBank), 数据库登录号为 MW166174~MW166194。

1.6 数据处理与分析

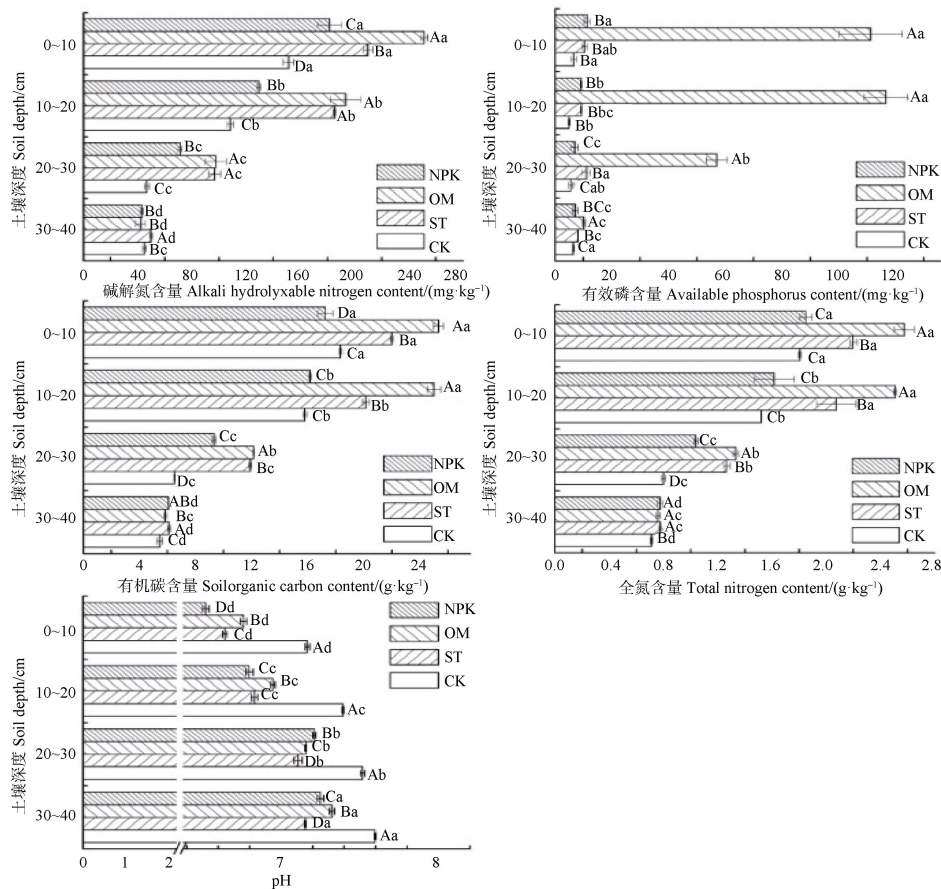
SPSS 20.0 软件对数据进行处理与统计分析; ORIGIN 9.0 软件对图形进行绘制。不同处理显著性用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行检验, 利用皮尔森 (Pearson) 相关分析方法对土壤氨氧化微生物丰度及环境因子进行相关性分析。用 Canoco 5 软件对数据进行冗余分析 (redundancy analysis,

RDA), 首先进行去趋势对应分析 (detrended correspondence analysis, DCA), 当排序轴梯度长度 (lengths of gradient, LGA) 第一轴大于 4.0 时, 适合典范对应分析 (canonical correspondence analysis, CCA), 当 LGA 小于 3.0 时, 适合 RDA 分析, LGA 介于 3.0~4.0 时, 选用 CCA 和 RDA 分析均可^[22]。DCA 分析结果显示, AOA 第一排序轴长度为 3.1, AOB 第一排序轴长度为 2.0, 故本研究采用 RDA 分析。

2 结果

2.1 长期施肥对稻田土壤基本理化性质及硝化势的影响

如图 1 所示, 长期施肥显著改变了土壤 AHN、Olsen-P、pH、SOC 和 TN 的含量。与 CK 处理相比,



注: 不同大写字母代表同一土层不同施肥处理间差异显著, 不同小写字母表示同一施肥处理不同土层间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。Note: Different capital letters indicate significant difference at 0.05 level among different fertilization treatment under the same soil layers. Different small letters indicate significant difference at 0.05 level among different soil layers under the same fertilization treatment ($P < 0.05$). The same below.

图 1 不同施肥处理下不同土壤深度理化性质

Fig. 1 Physical and chemical properties at different soil depths under different fertilization treatments

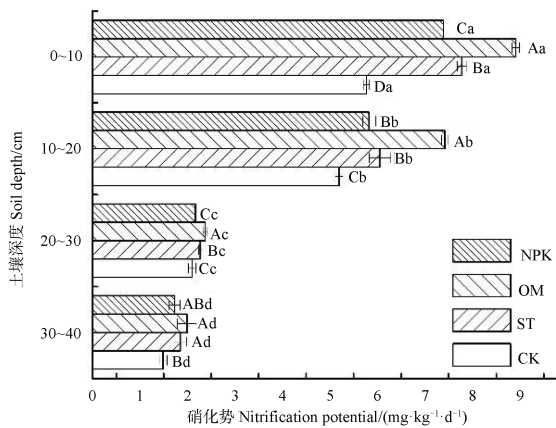
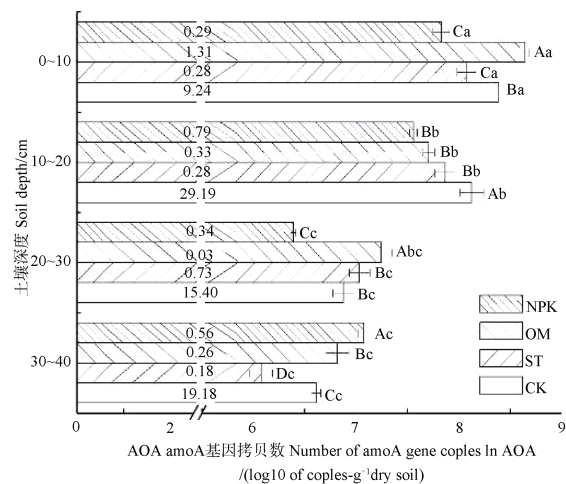
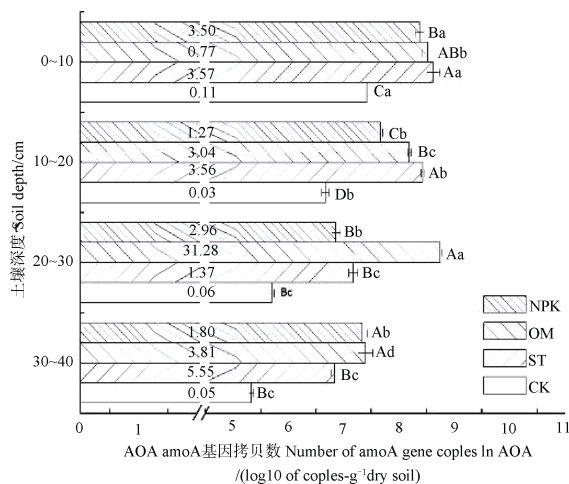


图2 不同施肥处理对各土层土壤硝化势的影响

Fig. 2 Nitrification potential at different soil depths under different fertilization treatments

施肥处理在0~30 cm土层均显著增加了土壤AHN、Olsen-P、SOC和TN含量 ($P < 0.05$), 其中OM处理下增加最多。相较CK、ST和NPK三种处理, OM处理使稻田土壤0~40 cm土层中的Olsen-P含量分别显著增加1.57倍~23.62倍、1.27倍~12.59倍和1.45倍~12.63倍。此外, 三种施肥方式较CK处理均降低了土壤pH。随着土壤深度的增加, 土壤pH表现出升高趋势。由图2可见, 长期施肥均显著增加各土层NP ($P < 0.05$), 且NP随土层的加深而逐渐减少。0~10 cm土层NP最高, OM处理下NP达到 $8.91 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 为CK处理的1.54倍。



注: AOA柱形上所标数字为 AOA/AOB 值, AOB柱形上所标数字为 AOB/AOA 值。Note: The number marked on the AOA columns are the AOA/AOB values. The number marked on the AOB columns are the AOB/AOA values.

图3 不同施肥处理下不同土壤深度氨氧化古菌 (AOA) 和氨氧化细菌 (AOB) 基因丰度

Fig. 3 Gene abundance of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in different soil depths under different fertilization treatments

2.2 长期施肥对稻田土壤 AOA 和 AOB 丰度的影响

长期施肥影响稻田土壤 AOA 和 AOB 的种群丰度 (图 3)。在不施肥土壤中不同土层 AOB 数量均高于 AOA 的数量, AOB/AOA 在 9.24~29.19 之间; 施肥处理下 0~40 cm 土层 AOA 占主导作用, 其与 AOB 在 0~40 cm 各土层的数量比值分别在 0.77~3.57、1.27~3.56、1.37~31.28 和 1.80~5.55 之间。不同施肥措施和土层的分化均使 AOA 和 AOB 丰度存在显著差异 ($P < 0.05$)。相比 CK 处理, 长期施肥显著提高了各土层中土壤 AOA 的种群丰度, 而不同土层中 AOB 的种群丰度对长期施肥处理的响应各不相同。在 0~10 cm 深度土壤中, 除 OM 处理下 AOB 种群丰度略有增长外, ST 和 NPK 处理均减小了 AOB 种群丰度; 在 10~20 cm 深度土壤中 AOB 种群丰度因施肥处理下降; 相对于不施肥处理, AOB 种群丰度在 20~30 cm 深度的 ST 和 OM 处理中显著增加; 在 30~40 cm 深度土壤中, 相比 CK 处理, 除 ST 降低了 AOB 种群丰度外, OM 和 NPK 处理均显著增加了 AOB 种群的丰度。

2.3 长期施肥对稻田土壤 AOA 和 AOB 群落组成的影响

运用 Illumina MiSeq 测序平台, 分别获得三万条 AOA 和 AOB 基因的有效序列, 利用美吉生信云在线分析平台对 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因序列进

行群落组成分析。选取相对丰度大于 1% 的 OTU 构建群落组成图和系统发育树(图 4 和图 5)。从 AOA、AOB 的 OTU 水平相对丰度变化图可以看出,相比 CK 处理,在 0~40 cm 土层中,长期施肥显著富集 OTU3、OTU67 和 OTU1041, ST 处理进一步富集 OTU2、OTU5、OTU65 和 OTU101, OM 处理富集 OTU66 和 OTU101, NPK 处理富集了 OTU5、OTU7 和 OTU65。此外,CK、ST、OM 和 NPK 处理中 OTU7、OTU958 和 OTU1041 的丰度随土层深度的增加而减少,而 OTU402 和 OTU948 的丰度则随土层深度的增加而增加。

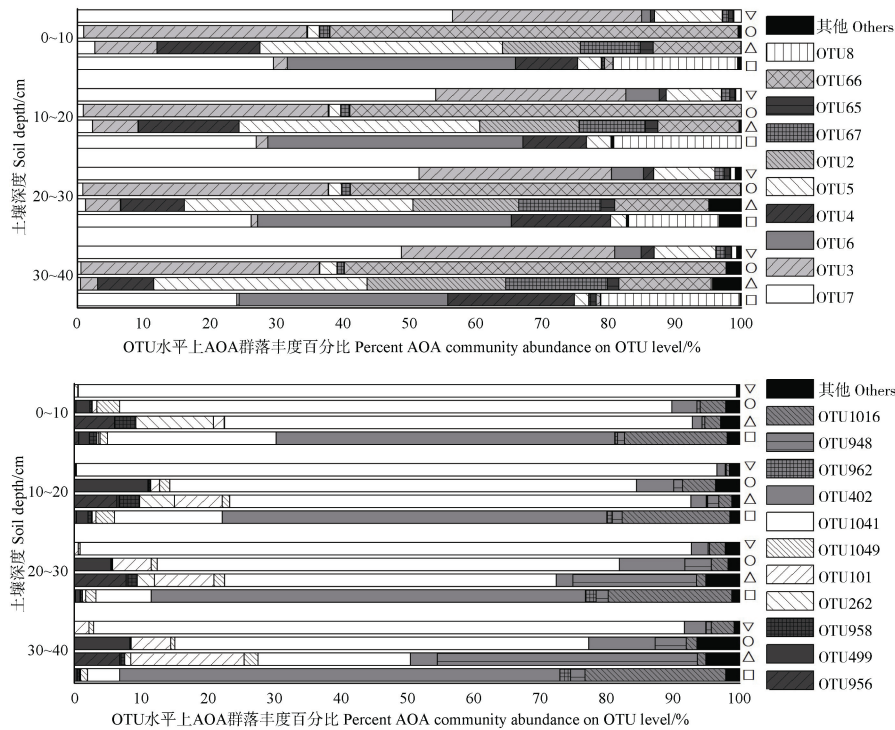
通过美国国家生物技术信息中心(NCBI)等数据库进行序列比对,利用 MEGA 软件构建系统发育树(图 5)。结果表明 AOA 的 OTU2、OTU65、OTU66 和 OTU67 与 *Nitrosocosmicus* 相近, OTU4 与 *Nitrosotalea* 相近, OTU5 与亚硝化螺菌属(*Nitrososphaera*)相近, OTU6 与细小亚硝化菌属(*Nitrosotenuis*)相近。AOB 的 OTU499、OTU956 和 OTU958 与亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)相近, OTU101、OTU262、OTU1041 和 OTU1049 与亚硝

化叶菌属(*Nitrosolobus*)相近, OTU402、OTU948、OTU962 和 OTU1016 与亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)相近。

2.4 AOA 和 AOB 群落结构与土壤理化性质的关系

皮尔森相关性分析(表 3)表明,水稻不同深度土壤 NP 和理化性质如 AHN、Olsen-P、SOC 和 TN 与 AOA、AOB 丰度具有极显著的正相关性($P<0.01$)。而 pH 与 AOA 和 AOB 丰度具有显著负相关性($P<0.05$)。

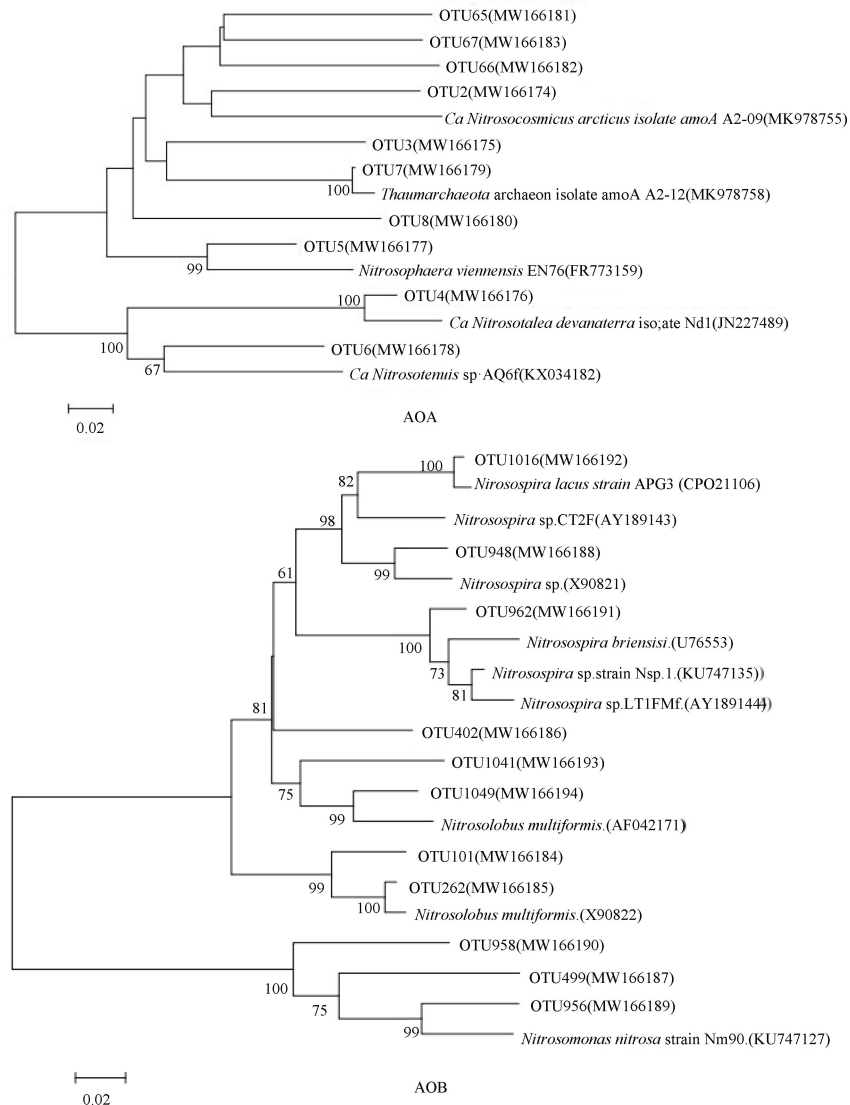
对 AOA、AOB 种群 OTU 组成与环境变量进行 RDA 分析(图 6),结果表明 X 轴和 Y 轴分别能够解释 AOA 和 AOB 群落结构总变异量的 52.67% 和 70.97%。土壤 Olsen-P 和 pH 分别在 AOA、AOB 第一排序轴上的投影长度较长,表明 Olsen-P 和 pH 分别对 AOA、AOB 种群的多样性组成具有显著影响。CK、ST、OM 和 NPK 处理在 AOA 种群 RDA 二维排序图中彼此分离,表明不同施肥措施显著影响氨氧化古菌的群落组成。AOB 种群 RDA 二维排序图显示氨氧化细菌群落结构的分化受施肥的影响差异显著。



注: OTUs: 操作分类单元。 Note: OTUs: operational taxonomic units. □: CK; △: ST; ○: OM; ▽: NPK.

图 4 不同施肥处理下不同土壤深度 AOA 和 AOB 基因群落组成

Fig. 4 Community composition of AOA and AOB at different soil depths under different fertilization treatments



注：各支上的数字是 1 000 次重抽样分析的支持百分比，小于 50 的省略，括号里的数字为基因序列在 Genbank 数据库中的登录号。Note: Values indicate the percentage of 1000 replicate trees supporting the branching order; values below 50 are omitted. The number in parentheses is the Genbank accession number.

图 5 AOA、AOB 基因系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic trees for AOA and AOB

表 3 长期施肥水稻土不同深度土壤理化性质与氨氧化微生物丰度相关性

Table 3 Pearson's correlation coefficients between the abundance of AOA, AOB and soil properties at different paddy soil depths under long-term fertilization

	AHN	Olsen-P	pH	SOC	TN	NP
AOA	0.602**	0.457**	-0.572**	0.532**	0.561**	0.476**
AOB	0.701**	0.473**	-0.359*	0.666**	0.658**	0.691**

注：AHN：碱解氮；Olsen-P：有效磷；SOC：有机碳；TN：全氮；NP：硝化势；*为在 0.05 水平上显著相关；**为在 0.01 水平上显著相关。下同。Note: AHN: alkali hydrolyzable nitrogen; Olsen-P: available phosphorus; SOC: soil organic carbon; TN: total nitrogen; NP: nitrification potential; * significant at $P < 0.05$, ** significant at $P < 0.01$.

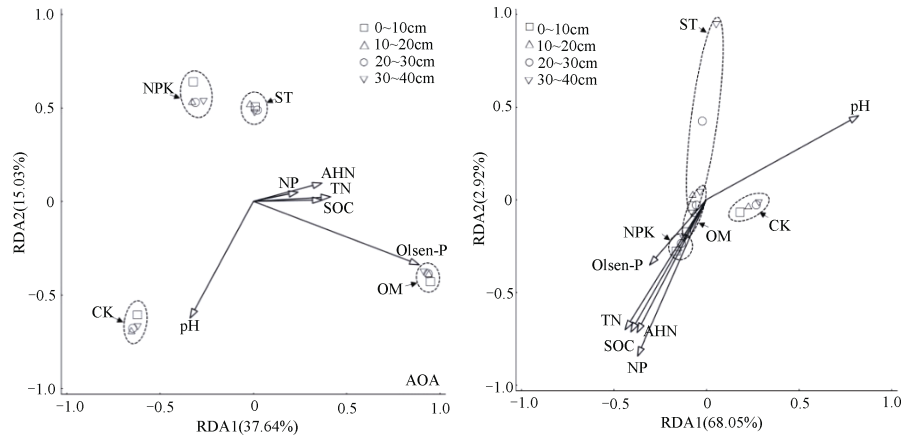


图 6 不同土层中 AOA、AOB 群落组成和理化及施肥因素的冗余分析 (RDA)

Fig. 6 Redundancy analysis (RDA) of AOA, AOB community compositions, soil properties and fertilization factors at different soil depths

3 讨论

3.1 长期施肥对土壤理化性质的影响

长期施肥显著影响稻田土壤不同土层土壤的理化性质^[23]。相比于短期施肥,长期施肥会使稻田土壤养分呈垂直分布的形式,养分的适度下移,可使稻田底土肥力系数增高^[24],但当养分下移的程度超过水稻根系所能吸收的范围,就将造成土壤养分流失、地下水污染等危害^[25]。CK 处理中养分的来源仅靠土壤中根茬的残留,养分不足,难以维持地力,而本研究中肥料的使用尤其是有机-无机肥的施用显著增加了土壤养分含量(图 1),表明施肥能够促进土壤养分的累积。此外,长期施肥均显著降低了土壤 pH,且全量化肥的施用在耕作层(0~20 cm)土壤中影响更甚,加剧了土壤酸化,这可能是因为肥料的施入增加了土壤中铵态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)和硝态氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)的含量,土壤中 NH_4^+ 的硝化作用或是 NO_3^- 的淋溶均会导致土壤中 H^+ 浓度的增加^[26]。

3.2 长期施肥对土壤氨氧化微生物丰度的影响

长期施肥引起稻田各土层环境因子改变的同时,也会导致稻田各土层氨氧化微生物的生理生态功能发生改变。本研究发现,长期施肥均显著提高了各土层 AOA 丰度(图 3),说明土壤养分的增加能显著促进 AOA 的生长与繁殖,这可能与 AOA 对不同施肥方式具有选择性和适应性有关^[27]。但是,各土层 AOB 丰度对施肥响应不一致。不施肥土壤 AOB 数量在各土层中均高于 AOA 的数量(图 3),说明在寡营养环境下,AOB 是土壤氨氧化作用的主

要执行者,这与毛新伟等^[28]、曹彦强等^[2]的研究结果稍有不同,其原因可能是毛新伟等^[28]、曹彦强等^[2]研究的土壤呈酸性或中性,而本研究的土壤 pH 在 7.17~7.60 之间,在 AOB 适宜生长 pH 范围(7.0~8.6)之内。研究发现,AOB 数量在水分含量较大的土壤或 pH 为中碱性的土壤中远超 AOA 的数量^[29],水稻生长过程反复经历水旱交替致使土壤 pH 接近中性^[30],施肥导致土壤酸化,从而使对 NH_3 具有较高亲和力并耐受缺氧环境的 AOA 在酸性稻田土壤中发挥主导作用^[31]。此外,通过相关性分析进一步表明,AOA、AOB 数量与土壤 AHN、Olsen-P、pH、SOC、TN 和土壤 NP 均存在显著相关关系(表 3),表明长期施肥导致的稻田各土层理化性质的差异显著影响 AOA、AOB 数量,进而影响土壤的硝化能力。土壤 AOA 和 AOB 的丰度在 0~30 cm 深度的 ST 和 OM 处理中均较 NPK 处理为高(图 3),响应了长期施肥下土壤 AHN、Olsen-P、SOC、TN 含量和 NP 的变化趋势,符合垂直分布特性,说明 0~30 cm 土层中秸秆有机肥和有机-无机肥的施用是影响土壤 AOA 和 AOB 丰度变化的重要诱因。

3.3 长期施肥对土壤氨氧化微生物群落组成的影响

肥料直接施入表土层使土壤表层微生物更易获取到充足的养分,促进 AOA、AOB 的生长繁殖,随着土壤深度的增加,底层微生物生长受限,数量减少,土壤养分的垂直分布会引起土壤微生物具有垂直分布特征。本研究稻田土壤 CK 处理下 AOA 群落优势 OTU 在不同土层中的比例无明显变化,但三

种施肥处理不同程度地改变了各土层中隶属于 *Nitrosocosmicus*、*Nitrososphaera*、*Nitrosotalea* 和 *Nitrosotenuis* 的 OTUs 比例 (图 4), 说明长期不同施肥措施导致的土壤碳、氮、磷等养分含量及 pH 的变化诱导了 AOA 种群结构的改变。稻田土壤 AOB 群落在不施肥处理下的优势菌属为 *Nitrospira*, 三种施肥方式增加了 *Nitrosolobus* 的比例, 同时 ST 和 OM 处理显著增加了 β -变形菌纲的亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 的比例, 研究表明 *Nitrosomonas* 易在较高浓度的有机物环境中积累^[32], 这与本研究结果 (图 4) 相符合。RDA 分析结果表明, Olsen-P 和 pH 分别对 AOA、AOB 群落组成的影响具有显著性, 其解释度分别为 31.5% 和 46.7% (图 6), 说明 Olsen-P 和 pH 分别是驱动 AOA、AOB 群落演替的关键因子; AOA 二维排序图中各施肥处理彼此分离, CK、NPK 处理中 0~10 cm 和 10~40 cm 土层也彼此分离 (图 6), 证明长期施肥和土层的分化对氨氧化古菌群落结构具有一定的影响。同理, 氨氧化细菌的群落结构受施肥措施的影响差异显著, 尤其是 ST 处理下 10~40 cm 土层的分化对 AOB 群落结构的影响更甚。

4 结 论

长期施肥如秸秆有机肥、有机-无机肥和全量化肥处理显著提高稻田 0~40 cm 土层碱解氮、有效磷、土壤有机碳和全氮的含量及土壤硝化势, 降低土壤 pH, 其中全量化肥处理在耕作层 (0~20 cm) 土壤中对土壤酸化的影响更大。长期不施肥稻田土壤 AOB 是氨氧化作用的主要驱动者, 长期施肥使稻田土壤酸化、促进 AOA 的生长, 表明 AOA 在硝化过程中具有潜在作用。三种施肥处理均显著富集 AOA 的 *Nitrosocosmicus* 和 AOB 的 *Nitrosolobus*。有效磷和 pH 分别为驱动土壤 AOA 和 AOB 群落结构演替的核心因子, 施肥措施和土层分化均对 AOA、AOB 群落结构具有显著影响。

参考文献 (References)

- [1] Guo Z Y, Jia Z J. Meta-analysis of soil nitrification activity in ecosystems typical of China[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2014, 51 (6): 1317—1324. [郭志英, 贾仲君. 中国典型生态系统土壤硝化强度的整合分析[J]. *土壤学报*, 2014, 51 (6): 1317—1324.]
- [2] Cao Y Q, Wang Z H, Mo Y L, et al. Effects of fertilization and water management on abundance of ammonia-oxidizing microorganisms in paddy soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56 (4): 1004—1011. [曹彦强, 王智慧, 莫永亮, 等. 施肥和淹水管理对水稻土氨氧化微生物数量的影响[J]. *土壤学报*, 2019, 56 (4): 1004—1011.]
- [3] Yang W N, Dong H P, Hou Q H, et al. Abundance, diversity and distribution characteristics of ammonia-oxidizing prokaryotes in sediments of Zhanjiang bay[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2018, 38 (2): 37—46. [阳雯娜, 董宏坡, 侯庆华, 等. 湛江湾沉积物中氨氧化微生物的丰度、多样性和分布特征[J]. *广东海洋大学学报*, 2018, 38 (2): 37—46.]
- [4] Zhao X, Cai S Y, Xing G X, et al. Nitrification and nitrogen leaching in tropical and subtropical acid soils[J]. *Soils*, 2020, 52 (1): 1—9. [赵旭, 蔡思源, 邢光熹, 等. 热带亚热带酸性土壤硝化作用与氮淋溶特征[J]. *土壤*, 2020, 52 (1): 1—9.]
- [5] Meng D L, Yang Y, Wu Y Z, et al. Effects of continuous cropping of vegetables on ammonia oxidizers community structure[J]. *Environmental Science*, 2012, 33 (4): 1331—1338. [孟德龙, 杨扬, 伍延正, 等. 多年蔬菜连作对土壤氨氧化微生物群落组成的影响[J]. *环境科学*, 2012, 33 (4): 1331—1338.]
- [6] Wang X L, Zhu F, Yao J, et al. Effect of long-term fertilization on community of ammonia oxidizers in acidic soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2018, 24 (2): 375—382. [王欣丽, 朱飞, 姚静, 等. 长期施肥对酸性土壤氨氧化微生物群落的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24 (2): 375—382.]
- [7] Wei W, Xu Y L, Zhu L, et al. Effect of long-term fertilization on soil microbial communities in farmland of black soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50 (2): 372—380. [魏巍, 许艳丽, 朱琳, 等. 长期施肥对黑土农田土壤微生物群落的影响[J]. *土壤学报*, 2013, 50 (2): 372—380.]
- [8] Qin Z X. Mineralization and ammonia-oxidizing microorganisms in neutral purple paddy soil from long-term fertilization experiment[D]. Chongqing: Southwest University, 2014. [秦子娴. 长期施肥中性紫色水稻土氮素矿化及氨氧化菌的分子生态学研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.]
- [9] Luo P Y, Fan Y, Yang J F, et al. Influence of long-term fertilization on abundance of ammonia oxidizing bacteria and Archaea in brown soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2017, 23 (3): 678—685. [罗培宇, 樊耀, 杨劲峰, 等. 长期施肥对棕壤氨氧化细菌和古菌丰度的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23 (3): 678—685.]

- [10] Xu B L, Zhong W H, Huang Q R, et al. Nitrification activity and autotrophic nitrifiers in long-term fertilized acidic upland soils[J]. *Environmental Science*, 2017, 38 (8): 3473—3482. [徐白璐, 钟文辉, 黄欠如, 等. 长期施肥酸性旱地土壤硝化活性及自养硝化微生物特征[J]. *环境科学*, 2017, 38 (8): 3473—3482.]
- [11] Höfflerle Š, Nicol G W, Pal L, et al. Ammonium supply rate influences archaeal and bacterial ammonia oxidizers in a wetland soil vertical profile[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 74 (2): 302—315.
- [12] Luo K, Hu R G, Zhang W J, et al. Response of black soil organic carbon, nitrogen and its availability to long-term fertilization[J]. *Environmental Science*, 2013, 34 (2): 676—684. [骆坤, 胡荣桂, 张文菊, 等. 黑土有机碳、氮及其活性对长期施肥的响应[J]. *环境科学*, 2013, 34 (2): 676—684.]
- [13] Xu H. Change characteristics of carbon, nitrogen and phosphorus of soil profile in China's typical cropland under long-term fertilization[D]. Guiyang: Guizhou University, 2017. [徐虎. 长期施肥下我国典型农田土壤剖面碳氮磷的变化特征[D]. 贵阳: 贵州大学, 2017.]
- [14] Li Y H, Sun T H, Li H B, et al. Effects of subsurface depths on pollutant removal with SWIS[J]. *Journal of Northeastern University(Natural Science Edition)*, 2010, 31 (5): 737—740. [李英华, 孙铁珩, 李海波, 等. 地下渗滤系统不同基质层对污染物的去除效果[J]. *东北大学学报(自然科学版)*, 2010, 31 (5): 737—740.]
- [15] Yang J M, Jiang X, Zhang Z Q, et al. Study on nitrification, denitrification and respiration in black soil based on BaPS system[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2014, 36 (1): 71—76, 88. [杨靖民, 姜旭, 张忠庆, 等. 基于 BaPS 系统黑土硝化、反硝化和呼吸作用研究[J]. *吉林农业大学学报*, 2014, 36 (1): 71—76, 88.]
- [16] Tao J J, Bai T S, Xiao R, et al. Vertical distribution of ammonia-oxidizing microorganisms across a soil profile of the Chinese Loess Plateau and their responses to nitrogen inputs[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 635: 240—248.
- [17] Qin H L, Zhang Z X, Lu J, et al. Change from paddy rice to vegetable growing changes nitrogen-cycling microbial communities and their variation with depth in the soil[J]. *European Journal of Soil Science*, 2016, 67 (5): 650—658.
- [18] Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000. [鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2000.]
- [19] Rotthauwe 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[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (12): 4704—4712.
- [20] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (41): 14683—14688.
- [21] 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[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 84: 28—37.
- [22] Leps J, Smilauer P. Multivariate analysis of ecological data using canoco[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2003.
- [23] Lin Q M, Liao C L, Xie L H, et al. Effects of groundwater tables and long-term fertilization on mineralization of organic carbon in red paddy soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56 (6): 1414—1424. [林清美, 廖超林, 谢丽华, 等. 地下水位和长期施肥对红壤性水稻土有机碳矿化特征的影响[J]. *土壤学报*, 2019, 56 (6): 1414—1424.]
- [24] Hu X J, Liu J J, Wei D, et al. Soil bacterial communities under different long-term fertilization regimes in three locations across the black soil region of northeast China[J]. *Pedosphere*, 2018, 28 (5): 751—763.
- [25] Lu R K, Shi Z Y, Lai Q W. Downward movement of nutrients in profile of red soil under long-term fertilization[J]. *Soils*, 2000, 32 (1): 27—29. [鲁如坤, 时正元, 赖庆旺. 红壤长期施肥养分的下移特征[J]. *土壤*, 2000, 32 (1): 27—29.]
- [26] Curtin D, Campbell C A, Jalil A. Effects of acidity on mineralization: pH-dependence of organic matter mineralization in weakly acidic soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30 (1): 57—64.
- [27] He J Z, Zhang L M. Molecular ecology of ammonia oxidizing bacteria and archaea in soil[C]. Chongqing: National Symposium on soil biology and Biochemistry, 2009. [贺纪正, 张丽梅. 土壤中氨氧化细菌和氨氧化古菌的分子生态学研究[C]. 重庆: 全国土壤生物和生物化学学术研讨会, 2009.]
- [28] Mao X W, Cheng M, Xu Q F, et al. Effects of nitrification inhibitors on soil N₂O emission and community structure and abundance of ammonia oxidation microorganism in soil under extensively managed *Phyllostachys edulis* stands[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53 (6): 1528—1540. [毛新伟, 程敏, 徐秋芳, 等. 硝化抑制剂对毛竹林土壤 N₂O 排放和氨氧化微生物的影响[J]. *土壤学报*, 2016, 53 (6): 1528—1540.]
- [29] Wu L H, Hui L H, Wang X Y, et al. Abundance and composition of ammonia-oxidising bacteria and Archaea of a degraded lake wetland, Inner Mongolian Plateau, China[J]. *Soil Research*, 2013, 51 (6): 554—560.
- [30] Poss R, Smith C J, Dunin F X, et al. Rate of soil

- acidification under wheat in a semi-arid environment[J]. *Plant and Soil*, 1995, 177 (1): 85—100.
- [31] Verhamme D T, Prosser J I, Nicol G W. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5 (6): 1067—1071.
- [32] Remmas N, Melidis P, Katsioui E, et al. Effects of high organic load on *amoA* and *nirS* gene diversity of an intermittently aerated and fed membrane bioreactor treating landfill leachate[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 220: 557—565.

(责任编辑: 陈荣府)