

DOI: 10.11766/trxb202203220126

夏围围, 李乙坤, 张萌, 孙祥鑫, 王玉芳, 贾仲君. 硝化微生物在土壤团聚体中的分布及其对种植方式的响应[J]. 土壤学报, 2023, 60(6): 1766–1777.

XIA Weiwei, Li Yikun, ZHANG Meng, SUN Xiangxin, WANG Yufang, JIA Zhongjun. Distribution Patterns of Nitrifiers within Soil Aggregates under Different Cropping Systems[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60(6): 1766–1777.

硝化微生物在土壤团聚体中的分布及其对种植方式的响应*

夏围围¹, 李乙坤¹, 张 萌¹, 孙祥鑫², 王玉芳², 贾仲君²

(1. 南京信息工程大学应用气象学院/江苏省农业气象重点实验室, 南京 210044; 2. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

摘 要: 硝化微生物在农田土壤氮转化过程中发挥重要作用, 深入开展团聚体中硝化微生物分布研究, 有助于揭示土壤结构-微生物-土壤营养元素循环间的相互影响机制。选取旱地黄棕壤为研究对象, 比较玉米连作(M-M)和玉米/花生轮作(M-P)两种种植方式下土壤团聚体的性质和硝化潜势(N_p)的变化, 并通过荧光定量 PCR 和高通量测序研究团聚体中不同类型硝化微生物功能基因的丰度和群落组成差异。结果表明, 与 M-M 相比, M-P 能够显著提高团聚体 pH、 NH_4^+ 和全碳(TC)含量。M-P 使 N_p 显著提高, 但团聚体粒径对 N_p 无显著影响。氨氧化细菌(AOB) *amoA* 基因丰度在 M-P 中高于 M-M, 且在较小粒径团聚体中分布更多, 而氨氧化古菌(AOA)和全程氨氧化细菌(Comammox) *amoA* 基因的分布模式与 AOB 大致相反, 表明 AOB 更能适应较小团聚体环境, AOA 和 Comammox 则倾向在较大团聚体中占据竞争优势。此外, 与 M-M 相较, M-P 团聚体间 AOA/AOB 和 Comammox/AOB 比值的差异减小, 表明轮作促使土壤硝化微生物在不同粒径间的分布更加均匀。进一步对属水平土壤团聚体硝化菌群落组成分析, 结果显示 M-P 提高了 *Nitrolancea* 属亚硝酸盐氧化细菌(NO₂)和 *Candidatus Nitrosocosmicus* 属 AOA 的占比, 降低了 *Nitrospira* 属 NOB 的占比, 对 AOB 各属无显著影响。而团聚体粒径仅对 *Nitrosospira* 属 AOB 的占比产生显著影响。 NH_4^+ 含量和 pH 是影响土壤团聚体 N_p 和硝化微生物群落变化的最主要因子。 N_p 与 AOB *amoA* 基因丰度显著正相关, 与 AOA *amoA* 基因丰度负相关。但在群落组成上, *Nitrosospira* 属 AOB, *Candidatus Nitrosocosmicus* 属 AOA 和 *Nitrospira* 属 NOB 均与 N_p 呈现正相关。土壤团聚体粒径和种植方式能较大程度影响硝化微生物的分布, 然而, 不同硝化微生物在团聚体间分异机制具有明显差异, 该研究为完善禾豆轮作下土壤硝化微生物在微域环境的生态适应机制提供了理论支持。

关键词: 团聚体; 硝化作用; 禾豆轮作; 硝化潜势; 氨氧化微生物

中图分类号: X171; S154.3 文献标志码: A

Distribution Patterns of Nitrifiers within Soil Aggregates under Different Cropping Systems

XIA Weiwei¹, Li Yikun¹, ZHANG Meng¹, SUN Xiangxin², WANG Yufang², JIA Zhongjun²

* 国家自然科学基金项目(42177280、41501267)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 42177280, 41501267)

作者简介: 夏围围(1986—), 女, 安徽淮南人, 博士, 副教授, 主要从事土壤微生物分子生态学研究。E-mail: wwwxia@nuist.edu.cn

收稿日期: 2022-03-22; 收到修改稿日期: 2022-06-14; 网络首发日期(www.cnki.net): 2022-09-23

(1. Jiangsu Key Laboratory of Agricultural Meteorology, College of Applied Meteorology, Nanjing University of Information Science and Technology, Nanjing 210044, China; 2. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: 【Objective】 Nitrifiers play an important role in the process of farmland soil nitrogen transformation. A study on the distribution of nitrifying microorganisms in aggregates will help to reveal the interaction mechanism between soil structure, microorganisms and soil nutrient cycling. 【Method】 The changes in soil aggregate properties and nitrification potential (N_p) in maize monoculture (M-M) and maize peanut rotation (M-P) were compared, and the abundance and community composition of different nitrifying functional genes in soil aggregates were evaluated by quantitative PCR and high-throughput sequencing. 【Result】 Compared with M-M, M-P significantly increased pH, NH_4^+ and total carbon (TC) in soil aggregates. M-P also significantly enhanced N_p , but the aggregate size had no significant effect on N_p . The abundance of the AOB *amoA* gene was higher in M-P and also more abundant in smaller aggregates. The distribution pattern of AOA and comammox *amoA* genes was opposite to that of AOB, indicating that AOB can better adapt to the micro-environment of smaller aggregates, while AOA and comammox tended to dominate in larger aggregates. In addition, compared with M-M, the difference in AOA/AOB and comammox/AOB ratio between M-P aggregates decreased, indicating that rotation promoted an even distribution of soil nitrifiers among different aggregate sizes. By further analysis of the nitrifying community based on the 16S rRNA gene sequencing, the results showed M-P increased the proportion of *Nitrolancea*-like NOB and *Candidatus Nitrosocosmicus*-like AOA, decreased the proportion of *Nitrospira*-like NOB, and had no significant effect on AOB compositions. The aggregate size only had a significant effect on the proportion of *Nitrosospora*-like AOB. NH_4^+ content and pH were the main factors affecting soil N_p and the nitrifying microbial community structure among soil aggregates. N_p was positively correlated with AOB *amoA* gene abundance and negatively correlated with AOA *amoA* gene abundance. However, in terms of community composition, *Nitrosospora*-like AOB, *Candidatus Nitrosocosmicus*-like AOA and *Nitrospira*-like NOB all showed positive correlations with N_p . 【Conclusion】 Soil aggregate size and cropping system can greatly affect the distribution of nitrifying microorganisms in soil aggregates. However, nitrifying microorganisms have different adaptation mechanisms among aggregates. This study provides a theoretical support for improving the ecological adaptation mechanism of soil nitrifying microorganisms in the micro-environments under Gramineae-Legume rotation.

Key words: Soil aggregates; Nitrification; Gramineae-Legume rotation; Nitrification potential; Ammonia oxidizer

团聚体是土壤结构的基本组成单位和土壤生态系统的功能单元，为微生物提供了空间异质的栖息场所。不同粒级团聚体上营养水平、湿度、氧气等微域环境的差异，必然会引起土壤微生物群落的空间分异，进而影响土壤养分转化和物质循环，重塑土壤团聚体的生物学性质。已有较多研究证明不同农田管理措施下，团聚体的粒级组成^[1]以及细菌和真菌群落多样性发生显著变化^[2-4]。但整体微生物群落多样性难以与特定生态过程建立直接联系，亟待加强关键功能微生物类群在团聚体粒级间的分配及其对生态功能影响的理论研究。

硝化作用是土壤氮素循环的关键过程，不仅降低农田土壤氮肥利用率，而且增加硝酸盐淋溶和温室气体 N_2O 排放风险。硝化作用的两个阶段分别由氨氧化菌和亚硝酸盐氧化细菌（NOB）催化完成。

氨氧化菌将铵根离子（ NH_4^+ ）氧化为亚硝酸盐（ NO_2^- ），此反应亦为硝化作用的限速步骤，已发现的氨氧化菌包括氨氧化古菌（AOA）、氨氧化细菌（AOB）和新发现的全程氨氧化细菌（Comammox）；继而，NOB 将 NO_2^- 氧化为硝酸盐（ NO_3^- ）。国内外研究表明 AOA 和 AOB 丰度和群落结构受土壤 pH、 NH_4^+ 含量、有机碳、土壤质地等因素影响^[5]。AOA 偏好于低营养水平和酸性土壤，且具有较高的氧胁迫耐受性，AOB 则相反；Comammox 对 NH_4^+ 亲和力更强，因此低营养状态下有更强竞争力^[6]。而 NOB 与氨氧化菌存在共生关系，氨氧化菌为 NOB 供给底物 NO_2^- ，NOB 为氨氧化菌清除 NO_2^- 毒害，还可以利用尿素产生氨供给 AOB^[7]。因此，解析硝化菌群在氮循环中的生理生态多样性一直被视为土壤生态研究的热点和难点。

近年来,土壤团聚体和硝化菌群之间的研究取得一定进展。Zhang等^[8]发现AOA和AOB对施肥和团聚体粒级的响应规律具有较大差异,但两者特征 $amoA$ 基因丰度均在最小粒级 $2\sim 0.1\ \mu\text{m}$ 中最低。Jiang等^[9]研究表明AOA和AOB $amoA$ 基因在最小粒级 $< 250\ \mu\text{m}$ 中富集,在粒级 $> 250\ \mu\text{m}$ 中较少。相反,Han等^[10]发现不同施肥措施下AOA和AOB $amoA$ 基因以及NOB $nxrB$ 基因的分布规律较为一致,且均倾向于富集在较大粒级($> 250\ \mu\text{m}$)。Hou等^[11]研究表明*Nitrosomonas*属AOB在 $< 250\ \mu\text{m}$ 团聚体中较为丰富,而*Nitrospira*属NOB在较大团聚体($> 250\ \mu\text{m}$)中更多。可见,不同类群硝化微生物随土壤团聚体粒级变化而呈现的分布模式并不一致。团聚体粒级的理化性质差异,可能是塑造硝化微生物群落分布特征的关键。深入开展不同粒级团聚体中硝化微生物功能群研究,能够进一步揭示土壤结构-微生物-土壤营养元素循环的相互影响机制^[4]。

本研究以旱地黄棕壤为研究对象,通过定量PCR和高通量测序等分子生物学手段揭示了硝化微生物群落不同粒级团聚体上的分异特征,并比较两种不同种植方式(玉米连作和玉米/花生轮作)对土壤团聚体性质和硝化微生物群落的影响。研究结果有助于理解土壤团聚体形成过程中微生物的环境适应机制,为土壤肥力评价和农田管理提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验地概况

试验区位于安徽省巢湖市栏杆集镇新桥村($31^{\circ}58'N$, $117^{\circ}50'E$),地处江淮丘陵南部,属北亚热带湿润季风气候区,光照充分,热量条件较好,无霜期长,季风气候显著,冬寒夏热,四季分明。年平均气温 $15\sim 16^{\circ}\text{C}$,年平均降水量约 $1\ 100\ \text{mm}$,主要集中在5—8月,占年总降水量的55%。典型土壤类型为下蜀黄土母质发育的黄棕壤。

1.2 试验设计和土壤采集

田间定位试验于2018—2019年进行。根据试验区内典型农业生产模式,在试验地设置2种处理,分别为玉米连作(M-M)和玉米/花生轮作(M-P)。试验开始前,选取一块地面平整的、土壤性质均匀的传统旱作农田,平均划分为2个小区。试验小区

第1年均种植玉米,第2年分别种植玉米和花生。作物每年4月播种,当年9月下旬收获,秋冬季抛荒,在试验第2年作物收获后采集土壤进行分析。玉米和花生种植过程中,基肥施用量相同,为复混肥料(N:P₂O₅:K₂O=26:10:15)900 kg·hm⁻²,玉米在大喇叭口期追施尿素150 kg·hm⁻²(N含量为46.4%),花生不追肥。其他管理措施如培土、除草等均按常规模式进行。

采集试验小区多个采样点0~20 cm土壤。取样时尽量避免挤压,以保持原状土壤结构。将采集的多点土壤样品混合组成代表土样。将稍大土块沿土壤自然结构脆弱面剥离成直径约5 mm小块,仔细挑除土样中的石块、植物根系。取其中一部分土壤用于团聚体粒径分级。M-M全土理化性质为:pH 6.16,全碳(TC)7.63 g·kg⁻¹,全氮(TN)0.82 g·kg⁻¹,NH₄⁺-N 1.20 mg·kg⁻¹,NO₃⁻-N 8.47 mg·kg⁻¹。M-P全土理化性质为:pH 6.65,TC 8.15 g·kg⁻¹,TN 0.91 g·kg⁻¹,NH₄⁺-N 4.69 mg·kg⁻¹,NO₃⁻-N 9.53 mg·kg⁻¹。

1.3 土壤团聚体筛分

采用干筛法^[2, 12]对土壤团聚体进行筛分,分离出 > 2 、 $2\sim 1$ 、 $1\sim 0.25$ 、 $< 0.25\ \text{mm}$ 四个粒级团聚体。步骤如下:取风干土样2.0 kg,使其通过一套直径20 cm筛组(孔径从上到下顺序为2 mm,1 mm和0.25 mm),筛组上方带盖,下方有底,收集通过土筛的样品。每次过筛的土样不宜过多,约为200 g。筛组先振荡5 min,收集最上面筛子上的团聚体($> 2\ \text{mm}$),再取下最上面1个筛子,继续振荡5 min,收集此时最上面筛子上的团聚体($2\sim 1\ \text{mm}$),依次筛分出 $1\sim 0.25\ \text{mm}$ 和 $< 0.25\ \text{mm}$ 团聚体。当筛分完成后,称量并计算各粒级团聚体占土样总质量的百分比(表1)。

1.4 土壤理化性质测定

土壤pH采用电位计法测定,首先对pH计进行校准,按水土比2.5:1向土壤加入无CO₂去离子水,之后将玻璃电极和饱和甘汞电极插入土壤悬液中进行读数。土壤无机氮采用氯化钾浸提,按水土比5:1向土壤加入2 mol·L⁻¹ KCl溶液,以200 r·min⁻¹振荡1 h,将振荡后的溶液静置后过滤,滤液采用连续流动化学分析仪(Skalar ++, Breda, Netherlands)对铵态氮(NH₄⁺-N)和硝态氮(NO₃⁻-N)含量进行

测定。土壤 TC 和 TN 含量的测定, 将土壤冷冻干燥并过 100 目筛, 利用碳氮元素分析仪 (Vario MAX CN, Germany) 进行测定。以上指标测定时, 均进行 3 次重复。

1.5 土壤硝化潜势测定

土壤硝化潜势 (Nitrification Potential) 通过悬浮液培养法测定^[13], 并略有改进。具体步骤为: 分别配置 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄) 溶液和 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钾 (K₂HPO₄) 溶液, 以及 0.05 mol·L⁻¹ 硫酸铵 ((NH₄)₂SO₄) 溶液适量。取 1.5 mL KH₂PO₄ 溶液, 7.5 mL K₂HPO₄ 溶液和 15 mL (NH₄)₂SO₄ 溶液, 分别溶于去离子水, 定容至 1.0 L, 并将 pH 调至 7.2, 制成土壤缓冲液。该土壤缓冲液含 1.5 mmol·L⁻¹ NH₄⁺ 和 1.0 mmol·L⁻¹ PO₄³⁻^[14]。称取各土样 5.0 g 于 50 mL 离心管, 加入 40 mL 土壤缓冲液, 倾斜置于摇床上 (200 r·min⁻¹) 震荡培养 24 h。分别在第 2、10、20、24 h 采集 6 mL 摇匀的土壤悬浮液, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液通过定量滤纸, 滤液保存于 -20℃ 冰箱。三次重复。通过连续流动化学分析仪 (Skalar ++, Breda, Netherlands) 测定滤液中 NO_x⁻-N 浓度。硝化潜势计算公式如下:

$$N_p = R \times \frac{V_1 + V_2}{m} \times 24$$

式中, N_p 代表硝化潜势 (mg·kg⁻¹·d⁻¹), R 为 NO_x⁻-N 增长速率 (mg·L⁻¹·h⁻¹), V_1 代表所加缓冲液体积 (L), V_2 代表土壤样品中水分体积 (L), m 为烘干土质量 (kg)。

1.6 土壤硝化微生物功能基因丰度测定

采用 Fast DNA[®] Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) 试剂盒, 按照试剂盒内说明书上的步骤提取土壤微生物 DNA。最终将提取到的土壤 DNA 溶解于 100 μL DES (无核酸酶超纯水)。利用微量紫外分光光度计 (Nano Drop[®] ND-2000 UV-Vis) 在 260 nm 处测定 DNA 浓度和纯度, 确保 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0 范围内, 避免腐殖质对后续 PCR 扩增的影响。最后, 用 DES 将土壤 DNA 进行 10 倍稀释, 保存于 -20℃ 冰箱。各粒级团聚体 DNA 提取均进行三次重复。

通过实时定量 PCR 技术对土壤不同类型硝化微生物功能基因进行定量分析。使用引物 amoA-1F/

amoA-2R^[15]、arch-amoA/Arch-amoAR^[16]和 comamoA/comamoAR^[17]分别对氨氧化微生物 AOB、AOA 和 Comammox 功能基因 *amoA* 进行定量扩增, 使用引物 nxrB169F/nxrB638R^[10]对亚硝酸盐氧化细菌 NOB 功能基因 *nxrB* 进行定量扩增。其中, 定量 PCR 反应体系总体积为 20 μL, 包括 0.2 μL 前、后置引物 (20 μmol·L⁻¹)、10 μL SYBR[®] Premix Ex Taq、1 μL DNA (标样或待测样), 剩余体积由灭菌水补充。标准样品的配制: 分别将含有待测目的基因的质粒, 以 10 倍梯度进行稀释, 制成 7~8 个浓度梯度的标准品, 与待测样品一起, 按上述步骤配制定量体系。每个 DNA 样品均进行 3 次重复扩增分析, 且每次均采用灭菌双蒸水作为阴性对照。实时荧光扩增定量反应在定量 PCR 仪 (Biorad CFX96 Optical Real-Time PCR System) 上进行。

1.7 高通量测序及生物信息分析

为探究土壤硝化微生物群落组成变化, 开展 16S rRNA 基因高通量测序分析。由上海美吉生物医药科技有限公司 (Shanghai Majorbio Bio-pharm Technology Co., Ltd) 对四个土壤团聚体粒级 DNA 样品中微生物 16S rRNA 基因 V4 区进行扩增 (引物 515F/907R) 和建库, 最后在 Illumina MiSeq 测序系统上进行双端测序, 继而在美吉生信云平台 (www.majorbio.com) 上进行生物信息分析。大致分析流程如下: 下机数据先进行拼接和质控, 根据 barcode 区分样本, 将所测序列在 97% 相似度水平划分 OTU (操作分类单元), 并以 silva138 数据库为参考进行物种注释。在属分类水平, 检索已知的 AOB^[18]、NOB^[19]和 AOA^[20]各属并统计丰度, 最终进行硝化微生物群落组成分析, 并通过 Spearman 相关分析探究硝化微生物群落组成变化与团聚体性质和硝化潜势的关联。

1.8 统计分析

通过 SPSS 19.0 统计软件, 采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析 Tukey 法对不同粒径和不同种植方式下理化因素、进行统计显著性检验; 采用双因素方差 (Two-way ANOVA) 分析检验种植方式和团聚体粒径之间是否存在交互效应; 并采用 Pearson 双尾 t 检验对硝化微生物基因丰度与理化因子间的相关性和统计显著性进行评估。 $P < 0.05$ 为具有统计显著性。采用 Origin 8.0 进行绘图。

2 结果

2.1 土壤团聚体的理化性质

土壤团聚体的理化性质见表 1。pH 方面, M-M 中, 除了 > 2 mm 团聚体外, 其他粒级团聚体 pH 随着团聚体粒径的减小而增加。相反, M-P 土壤团聚体 pH 总体随着团聚体粒径的减小而降低。M-M 土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量随着团聚体粒径的减小而增加。而 M-P 土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量随团聚体粒径呈现两头低中间高的分布特点, 其中, > 2 mm 团聚体 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量最低。M-M 土壤 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量大致随着团聚体粒径的减小而降低。M-P 土壤 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量随团聚体粒径

呈现两头低中间高的分布趋势。土壤 TC 含量, 在 M-M 土壤中随着团聚体粒径的减小而增加, 在 M-P 土壤中, 除 2~1 mm 外的其他三个粒级之间差异均不显著。M-M 土壤 TN 含量总体随着团聚体粒径的减小而增加 (0.75~0.88 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 而 M-P 土壤 TN 在 < 0.25 mm 粒级最低为 8.01 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 在其他三个粒级之间差异均不显著。双因素方差分析结果表明, 种植方式能显著提高团聚体 NH_4^+ 、pH 和 TC 含量, 土壤团聚体粒径对 NH_4^+ 、 NO_3^- 、pH 和 TC 均有显著影响, 单一因素 (种植方式或团聚体粒径) 均未对 TN 产生显著影响, 但是两因素的交互效应在以上五种理化性质的分异中均达到显著水平 ($P<0.05$)。

表 1 两种种植方式下土壤团聚体的理化性质

Table 1 Soil aggregate properties under different cropping systems

种植方式 Cropping system	粒级 Size/ (mm)	土壤团聚体 Soil aggregate					
		百分比 Proportion	pH	全碳 TC/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	全氮 TN/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	铵态氮 $\text{NH}_4^+\text{-N}/$ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	硝态氮 $\text{NO}_3^-\text{-N}/$ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
M-M	> 2	16.5%	6.05±0.04bB	6.62±0.03dB	0.80±0.02bB	0.77±0.06cB	8.89±0.04bA
	2~1	31.1%	5.99±0.06bB	7.41±0.36cB	0.75±0.09abB	1.18±0.09bB	9.17±0.06aB
	1~0.25	40.5%	6.07±0.02bB	8.50±0.06aA	0.86±0.06abA	1.57±0.02aB	8.50±0.01cB
	< 0.25	11.9%	6.14±0.03aB	8.27±0.03bA	0.88±0.04aA	1.56±0.11aB	7.25±0.57dA
M-P	> 2	13.0%	6.77±0.03aA	8.21±0.06aA	0.91±0.01aA	2.91±0.23cA	7.33±0.04bB
	2~1	22.3%	6.65±0.07bA	8.01±0.11bA	0.90±0.03aA	5.44±0.03aA	9.84±0.15aA
	1~0.25	52.0%	6.45±0.01cA	8.14±0.02aB	0.90±0.01aA	5.26±0.30aA	9.27±0.48aA
	< 0.25	12.7%	6.47±0.02cA	8.23±0.05aA	0.79±0.01bB	4.29±0.18bA	7.42±0.11bA

注: 表中值为平均值 ± 标准差 ($n=3$)。M-M 代表玉米连作, M-P 代表玉米/花生轮作。大写字母不同表示种植方式之间差异显著; 小写字母不同表示粒级之间差异显著。 $P<0.05$ 。下同。Note: Values were mean ± standard deviation ($n=3$). M-M represents maize monoculture, and M-P represents maize peanut rotation. Different capital letters in the same column represented a significant difference between cropping systems, and different lowercase letters in the same column represented a significant difference among soil aggregate sizes ($P<0.05$). The same below.

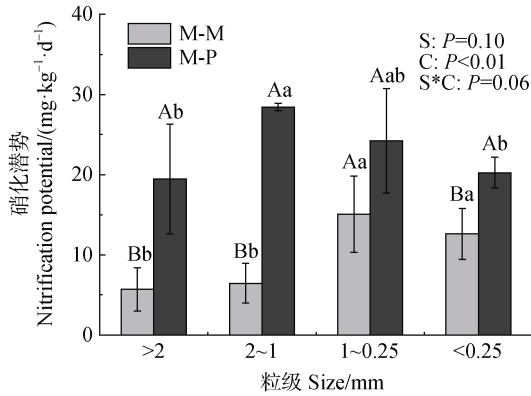
2.2 土壤团聚体的硝化活性

四个粒级间的土壤团聚体硝化潜势 (N_p) 如图 1。轮作 M-P 土壤团聚体的硝化潜势普遍高于连作 M-M 土壤。连作 M-M 土壤团聚体硝化潜势为 5.70~15.08 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 且在较小粒级 (1~0.25 mm 和 < 0.25 mm) 中显著高于较大粒级 (2~1 mm 和 > 2 mm)。轮作 M-P 土壤团聚体硝化潜势为 19.46~28.43 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 在 2~1 mm 粒级中最高。双因素方差分析 (图 2) 表明种植方式对土壤硝化潜势有显著影响, 团聚体粒径对硝化潜势影响不显著, 且

二者的交互效应亦不显著。

2.3 土壤团聚体上硝化微生物功能基因的分布

团聚体中 AOB *amoA* 基因丰度 (图 2a) 在 M-P 土壤明显高于 M-M 土壤 (1~0.25 mm 除外), 且在 < 0.25 mm 粒级中数量最高, 表明 AOB 更能适应较小团聚体的微域环境。AOA *amoA* 基因 (图 2b) 在 M-M 土壤显著高于 M-P 土壤, 且在团聚体上的分布趋势与 AOB *amoA* 基因大致相反, 在 > 2 mm 粒级中基因数量最高, 表明 AOA 更能适应较大团聚体的微域环境。Comammox *amoA* 基因 (图 2c) 在两种土



注：C，种植方式的影响；S，团聚体粒径的影响；C×S，种植方式和团聚体粒径的交互效应。显著性效应， $P < 0.05$ 。下同。Note: C, the effect of cropping system; S, the effect of aggregate size; S×C, the effect of both cropping system and aggregate size. Significant effects, $P < 0.05$. The same below.

图1 不同种植方式下土壤团聚体的硝化潜势差异

Fig. 1 Nitrification potentials within soil aggregates under different cropping systems

壤的分布模式有较大差异，在 M-M 土壤 > 2 mm 粒径中最高，而在 M-P 中随团聚体粒径呈现两头高中间低的分布趋势。NOB *nxB* 基因 (图 2d) 亦在

M-M 中高于 M-P，且随团聚体粒径呈现两头高中间低的分布趋势，在 < 0.25 mm 粒径中数量最高。双因素方差分析 (图 3) 表明土壤团聚体粒径和种植方式均能较大程度影响以上硝化微生物在土壤中的分布。

以 *amoA* 基因为分子标靶，连作 M-M 土壤中 AOA/AOB 比值随着团聚体粒径的减小而减小 (1.56~3.92) (图 3a)，Comammox/AOB 比值的变化趋势与上述一致 (0.15~0.46) (图 3b)，表明 AOA 和 Comammox 在较大粒径团聚体上更具竞争优势，而 AOB 则相反。M-P 土壤中上述比值的变化趋势与 M-M 土壤相似，但随团聚体粒径减小，上述比值的变化幅度均小于 M-M 土壤。M-P 中 AOA/AOB 和 Comammox/AOB 比值的变化范围分别为 0.87~1.58 和 0.18~0.24。Comammox/AOA 比值在 M-M 土壤团聚体之间无显著变化 (0.10~0.12)，在 M-P 土壤中呈现中间高两头低 (0.13~0.21) (图 3c)，且普遍高于 M-M (2~1 mm 粒径除外)。综上所述，不同氨氧化微生物在团聚体上的分布规律具有明显差异。

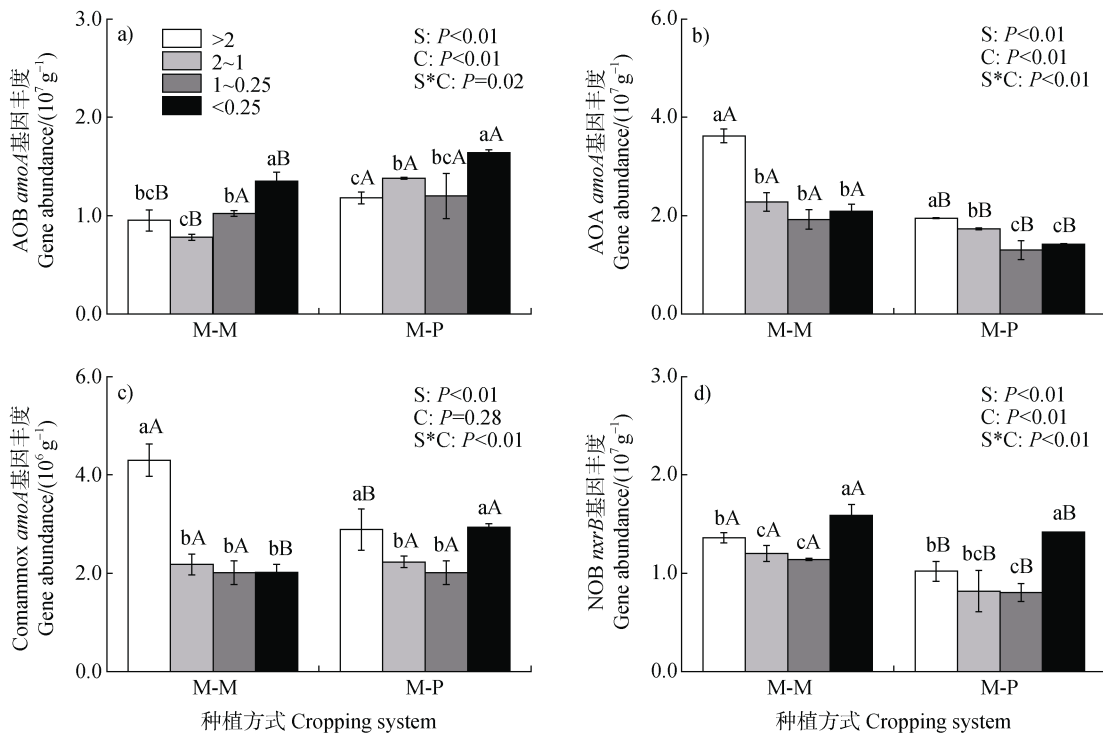


图2 不同粒径土壤团聚体上硝化微生物功能基因丰度的差异

Fig. 2 Abundance changes of nitrifying functional genes in different soil aggregate sizes

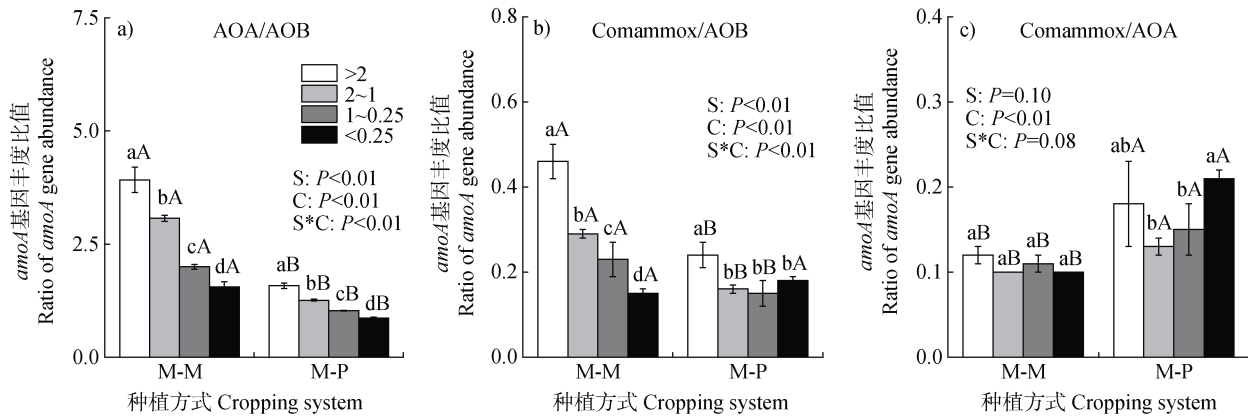


图3 不同粒径土壤团聚体上氨氧化微生物 *amoA* 基因比值的变化

Fig. 3 *amoA* gene ratios of different ammonia-oxidizing groups in different soil aggregate sizes

2.4 土壤团聚体性质与硝化微生物功能基因丰度及硝化活性的关联

硝化微生物 *amoA* 基因丰度在团聚体间的分布,受微域环境强烈影响(表 2)。在不同粒级团聚体间,就氨氧化微生物而言, AOB *amoA* 基因丰度与 pH、TC 和 NH_4^+ 含量显著正相关,与 NO_3^- 含量显著负相关。AOA 与 AOB 则完全相反,其 *amoA* 基因丰度与 pH、TC 和 NH_4^+ 含量均呈现显著负相关。而 Comammox *amoA* 基因丰度仅与 TC 显著负相关。对于 NOB, 团聚体 pH、 NH_4^+ 和 NO_3^- 含量的增加, 均能显著降低 *nxrB* 基因丰度。并且,进一步分析土壤理化性质及硝化微生物与团聚体硝化潜势间的相关性发现, pH 和 NH_4^+ 含量是影响团聚体硝化潜势 N_p 的主要因素

($P < 0.01$, r 分别为 0.800 和 0.889), TN 亦对 N_p 存在显著性影响 ($r = 0.485$)。而硝化微生物中 AOB *amoA* 基因丰度与 N_p 显著正相关 ($r = 0.588$), AOA *amoA* 基因丰度与 N_p 显著负相关 ($r = -0.686$), Comammox *amoA* 基因与 N_p 不存在显著性关联。

2.5 土壤团聚体性质与硝化微生物群落组成的关联

对 24 个团聚体 DNA 样品进行高通量测序, 共获得 16S rRNA 基因序列约 111.8 万条, 平均每个样品约 4.66 万条, 硝化微生物的平均相对丰度约为 1.02% (473 条/样), 其中, AOA、AOB 和 NOB 的平均相对丰度分别为 0.51% (239 条/样)、0.08% (36 条/样) 和 0.43% (199 条/样)。

表 2 土壤团聚体理化性质、硝化微生物功能基因丰度以及硝化潜势之间的相关分析

Table 2 Correlation analysis between soil properties, nitrifying functional gene abundances and nitrification potential

指标 Index	硝化菌 Nitrifier	土壤团聚体 Soil aggregate					
		pH	TC	TN	NH_4^+	NO_3^-	土壤硝化潜势 (N_p)
基因丰度 Gene abundance	AOB <i>amoA</i>	0.548**	0.480*	0.150	0.513*	-0.425*	0.588**
	AOA <i>amoA</i>	-0.576**	-0.742**	-0.324	-0.754**	0.086	-0.686**
	Comammox <i>amoA</i>	-0.037	-0.730**	-0.263	-0.301	-0.018	-0.330
	NOB <i>nxrB</i>	-0.558**	0.020	-0.325	-0.660**	-0.697**	-0.687**
<i>amoA</i> 基因丰度比值 Ratio of <i>amoA</i> gene abundance	AOA/AOB	-0.693**	-0.777**	-0.451*	-0.779**	0.250	-0.794**
	Comammox/AOB	-0.354	-0.824**	-0.335	-0.583**	0.177	-0.690**
	Comammox/AOA	0.677**	0.157	0.108	0.558**	-0.258	0.441
土壤硝化潜势 (N_p)		0.800**	0.412	0.485*	0.889**	0.207	1.000

注: Pearson 双尾显著性检验, $n=24$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。Note: Pearson's two-tailed t test, $n=24$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

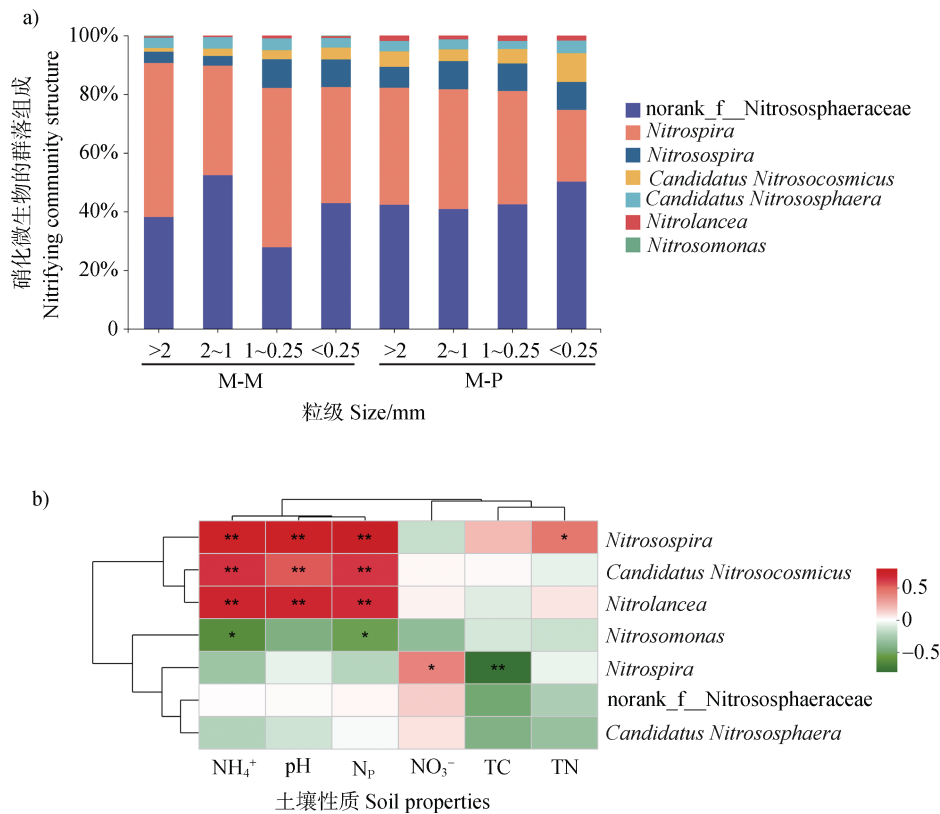
通过 16S rRNA 基因高通量测序分析, 揭示了不同种植方式下土壤团聚体中硝化微生物群落组成 (图 4a)。在试验土壤中, AOA 主要检测到三个属, 分别为 *Candidatus Nitrosocosmicus*, *Candidatus Nitrososphaera* 和 *norank_f_Nitrososphaeraceae*, 其中 *norank_f_Nitrososphaeraceae* 最多; AOB 主要包括 *Nitrosospira* 和 *Nitrosomonas* 两属, 且 *Nitrosospira* 远高于 *Nitrosomonas*; NOB 主要包括 *Nitrospira* 和 *Nitrolancea* 两属, 且 *Nitrospira* 占据主导。总体而言, 各类硝化菌在整体硝化微生物群落中的占比大小顺序为: AOA>NOB>AOB。双因素方差分析 (表 3) 表明, 种植方式能够对 *Nitrospira* 属和 *Nitrolancea* 属 NOB, 以及 *Candidatus Nitrosocosmicus* 属 AOA 在硝化群落中的占比产生显著影响, 而团聚体粒径仅对 *Nitrosospira* 属 AOB 的占比产生显著影响, 但两者交互效应在各类型硝化微生物中均不显著。

NH_4^+ 含量和 pH 是影响土壤团聚体硝化微生物

群落组成变化的最主要因子 (图 4b)。团聚体 NH_4^+ 含量和 pH 提高, 对 *Nitrosospira* 属 AOB, *Candidatus Nitrosocosmicus* 属 AOA 和 *Nitrospira* 属 NOB 均有显著促进作用。相反地, NH_4^+ 含量增加对 *Nitrosomonas* 属 AOB 却存在显著抑制效应。此外, TC 与 *Nitrospira* 属 NOB 显著负相关, TN 与 *Nitrosospira* 属 AOB 显著正相关。对硝化活性的影响方面, *Nitrosospira* 属 AOB, *Candidatus Nitrosocosmicus* 属 AOA 和 *Nitrospira* 属 NOB 均与团聚体 N_p 存在显著正相关关系。

3 讨论

合理轮作能够协调养分供应, 均衡利用土壤养分, 防止连作障碍, 具有很高的生态和经济效益^[21]。与连作相比, 轮作可改善连作土壤结构, 提高土壤酶活性, 促进土壤的代谢作用, 促使土壤养分形态



*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。

图 4 基于 16S rRNA 基因的硝化微生物群落组成 (a) 及与土壤性质和硝化潜能的相关系数热图分析 (b)

Fig. 4 Nitrifying community structures based on 16S rRNA genes (a) and their correlation with soil properties and nitrification potential by heatmap analysis (b)

表 3 双因素方差分析种植方式和团聚体粒径对氨氧化古菌、氨氧化细菌和亚硝酸盐氧化细菌组成的影响 (P 值)

Table 3 Results (P values) of a two-way ANOVA analysis for the effects of cropping system and soil aggregate size on dominant phylotypes of AOA, AOB and NOB

硝化菌	属水平分类	C	S	C×S
Nitrifier	At the genus level			
AOA	<i>Candidatus</i>	0.001*	0.055	0.319
	<i>Nitrosocosmicus</i>			
	<i>Candidatus</i>	0.481	0.947	0.374
	<i>Nitrososphaera</i>			
AOB	Norank_f_	0.359	0.323	0.263
	<i>Nitrososphaeraceae</i>			
	<i>Nitrososphaera</i>			
AOB	<i>Nitrososphaera</i>	0.067	0.042*	0.237
	<i>Nitrosomonas</i>	0.053	0.261	0.261
NOB	<i>Nitrospira</i>	0.027*	0.150	0.425
	<i>Nitrolancea</i>	0.000*	0.543	0.833

*, $P < 0.05$.

发生变化,从而提高土壤肥力^[12]。花生作为一种豆科植物,被广泛用于间、套、轮作,能够增加作物产量、培肥土壤、改善农田生态条件^[22-23]。与前人研究一致,本研究结果显示与玉米连作(M-M)相比,玉米/花生轮作(M-P)能够提高土壤全土及团聚体 pH、 NH_4^+ 和 TC 含量。

同时,轮作能够通过根系向土壤输送更加多样的营养物质,提高土壤微生物群落多样性^[24]。对于硝化微生物而言,轮作 M-P 提高了团聚体中 AOB *amoA* 基因丰度,而降低了 AOA *amoA* 基因丰度,导致四个粒级团聚体上 AOA/AOB 和 Comammox/AOB 比值的差异减小,表明轮作促使土壤硝化微生物在粒级间的分布更加均匀。曹莉等^[25]研究也显示轮作方式能够提高硝化细菌的数量。进一步在分类属水平对土壤团聚体中硝化菌群组成进行分析,结果显示轮作提高了 *Nitrolancea* 属 NOB 和 *Candidatus Nitrosocosmicus* 属 AOA 的比例,降低了 *Nitrospira* 属 NOB 的比例,对 AOB 各属无显著影响。此外, M-M 土壤团聚体的硝化潜势普遍低于 M-P 土壤,表明 M-P 土壤硝化活性提高。可见,种植方式对土壤团聚体养分状况、生物学特性以及生态过程均产生了较大影响,为禾豆轮作下土壤硝化微生物的生态适应理论提供了支持。

地理大尺度数据整合分析显示,陆地生态系统中 AOB 和 AOA *amoA* 基因丰度和群落组成受到多种环境因素影响^[5, 18, 26],其中, pH 和 NH_4^+ 尤为关键^[5]。本研究中同样发现在微域尺度上团聚体 pH 与 NH_4^+ 含量显著正相关 ($r = 0.62, P < 0.01$),均对 AOA 和 AOB 丰度和组成均产生了显著影响。两者与团聚体 AOB *amoA* 基因丰度正相关,与 AOA *amoA* 基因丰度负相关,表明 AOA 和 AOB 具有不同的营养需求和底物利用能力。较多研究已经证实低铵或酸性条件下 AOA 快速生长;而在高铵或中性-碱性土壤中, AOB 更具生长活性^[5, 27]。通过生态位竞争, AOB 和 AOA 在微域尺度上形成了各自独特分布模式, AOB 偏好栖息在 NH_4^+ 含量较高、比面积较大的微团聚体 ($< 0.25 \text{ mm}$) 上,而 AOA 则在 NH_4^+ 含量较低的大团聚体 ($> 2 \text{ mm}$) 环境更具竞争优势。此外, TC 也与 AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度显著关联 ($P < 0.05$),一方面可能由于 TC 矿化能够增加土壤可利用 NH_4^+ 作为硝化底物,从而刺激氨氧化菌的生长,另一方面 TC 还能够满足异养或混合营养生长的氨氧化菌群对碳源需求^[28]。团聚体中 Comammox 能够与 AOB 和 AOA 共存,且与 AOA 分布模式更为相似,表明两者的营养需求更为接近^[29]。

Zhang 等^[8]曾对黄棕壤 (pH 6.3) 团聚体进行研究,发现 TN 和 C/N 能够影响氨氧化微生物丰度,但未对 pH 和 NH_4^+ 进行检测。Han 等^[10]发现在酸性 (pH 5.7) 旱地农田土壤团聚体中 NH_4^+ 与 AOB 和 AOA *amoA* 基因丰度正相关,但 TN 和 TC 对 *amoA* 基因丰度变化的贡献度高于 NH_4^+ ,未对团聚体 pH 进行检测。Jiang 等^[9]对长期施肥管理下酸性 (pH 4.62~6.79) 农田土壤进行研究,发现 TC 和 pH 分别是影响团聚体上 AOA 和 AOB 丰度和组成主要因素。Li 等^[30]发现在碱性土壤 (pH > 8) 中,不同粒级团聚体 AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度变化由不同环境因子所驱动, TN、SOC 和 NO_3^- 与 AOA 群落组成显著关联,而 pH 和 SOC 是影响 AOB 群落的主要因素。由此可见,硝化微生物在团聚体粒级间的分布模式受到土壤类型、耕作方式、施肥管理等多因素共同作用,与团聚体形成和性质密不可分。由于目前土壤团聚体的研究方法缺乏统一标准,粒径划分、筛分方法以及检测指标等不一致,极大增加了对已有数据的整合难度。硝化作用各功能菌群在团聚体微域环境的分异机制有待深入挖掘。

全球范围内土壤硝化速率与土壤 pH、SOC、TN、 NH_4^+ 、AP 等显著正相关，与 C/N 显著负相关^[31]。在微域尺度（团聚体水平）上，环境因子如何影响土壤团聚体硝化速率尚不明确。由于土壤团聚体的原位硝化速率较难获取，本研究试图通过传统的悬浮培养法测定团聚体硝化潜势，以比较不同粒级团聚体的硝化活性。结果表明 pH、 NH_4^+ 和 TN 能显著影响团聚体硝化潜势，与全球尺度下的研究结果较为一致。土壤 N_p 与 AOB *amoA* 基因丰度显著正相关，与 AOA *amoA* 基因丰度显著负相关，表明 AOB 是旱地农田原位状态下硝化作用的驱动者，但与高氮投入下活性硝化微生物类群也保持高度一致^[32]。由此可见，虽然微域尺度上各因素变化幅度十分微小，但仍能显著影响硝化微生物的分布和活性。

目前团聚体水平硝化活性与硝化微生物的关联报道十分有限，硝化潜势与不同类型硝化微生物（如 AOB/AOA）的相关性并不一致^[8-9, 11]，也可能与硝化潜势测定方法的局限性有关。最新研究指出土壤硝化潜势的测定方法存在不足，理论“最佳”条件下测定的土壤硝化潜势不一定代表原位土壤硝化活性^[33]。然而，当前未能解决检测土壤团聚体真实硝化活性的技术难点。原位稳定同位素标记结合 Nano SIMS 亚细胞成像技术有望成为阐明土壤中目标微生物活跃类群空间分布规律的有力突破点^[34]。通过稳定同位素（ ^{13}C 或 ^{15}N 底物）在原位条件标记土壤硝化微生物生物物质，继而在实验室进行团聚体筛分，再利用 Nano SIMS 亚细胞成像技术进行硝化微生物细胞活性分析，或许可以提供更为准确的、能够反映自然条件下微生物活性及空间分布的信息。

值得注意的是，本研究中禾豆轮作只进行了一轮，相关土壤结构和微生物变化是在不同作物茬口下得到的，虽然能够最大程度体现种植不同作物产生的直接影响，但无法评估这些土壤结构及微生物变化的可持续性和生态效益。因此，未来可实施多年轮作，并在相同茬口和不同茬口下进行土壤和作物的多维分析，以便获取连续、详实而全面的轮作“茬口”效应研究结果。

4 结 论

玉米连作和玉米/花生轮作方式下，种植方式和团聚体粒径对土壤团聚体的多种理化性质均产生较

大影响，且种植方式能够强烈改变土壤硝化潜势。土壤团聚体粒径和种植方式还能较大程度影响硝化微生物在土壤团聚体中的分布，不同氨氧化微生物在团聚体上的分异规律具有明显差异。AOB *amoA* 基因丰度在轮作土壤显著高于连作土壤，且 AOB 更能适应较小团聚体环境；而 AOA 和 Comammox *amoA* 基因丰度变化与 AOB 则大致相反，倾向在较大团聚体中更占优势。此外，团聚体微域环境对不同类型硝化微生物的群落组成还存在不同程度影响。

参考文献 (References)

- [1] Wang H, Han S, Tang S, et al. Continuous multi-year application of Chinese milk vetch in paddy soil and its effect on soil aggregates distribution and their carbon and nitrogen content[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2022. DOI: 10.11766/trxb202106090303. [王慧, 韩上, 唐杉, 等. 紫云英翻压还田对稻田土壤团聚体组成及其碳氮的影响[J]. *土壤学报*, 2022. DOI: 10.11766/trxb202106090303.]
- [2] Tong L H, Zhu L, Lv Y Z, et al. Response of organic carbon fractions and microbial community composition of soil aggregates to long-term fertilizations in an intensive greenhouse system[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2020, 20 (2): 641—652.
- [3] Jiang X Y, Zhang Q Q, Shen H J, et al. Effects of biochar on soil aggregate stability and microbial community in paddy field[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58 (6): 1564—1573. [蒋雪洋, 张前前, 沈浩杰, 等. 生物质炭对稻田土壤团聚体稳定性和微生物群落的影响[J]. *土壤学报*, 2021, 58 (6): 1564—1573.]
- [4] Li N, Han X Z, You M Y, et al. Research review on soil aggregates and microbes[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2013, 22 (9): 1625—1632. [李娜, 韩晓增, 尤孟阳, 等. 土壤团聚体与微生物相互作用研究[J]. *生态环境学报*, 2013, 22 (9): 1625—1632.]
- [5] Prosser J I, Hink L, Gubry-Rangin C, et al. Nitrous oxide production by ammonia oxidizers: Physiological diversity, niche differentiation and potential mitigation strategies[J]. *Global Change Biology*, 2020, 26 (1): 103—118.
- [6] Koch H, van Kessel M A H J, Lüscher S. Complete nitrification: Insights into the ecophysiology of comammox *Nitrospira*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103 (1): 177—189.
- [7] Koch H, Lüscher S, Albertsen M, et al. Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112 (36): 11371—11376.
- [8] Zhang Q, Liang G Q, Myrold D D, et al. Variable responses of ammonia oxidizers across soil particle-size fractions affect nitrification in a long-term fertilizer

- experiment[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2017, 105: 25—36.
- [9] Jiang Y J, Jin C, Sun B. Soil aggregate stratification of nematodes and ammonia oxidizers affects nitrification in an acid soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16 (10): 3083—3094.
- [10] Han S, Luo X S, Tan S, et al. Soil aggregates impact nitrifying microorganisms in a vertisol under diverse fertilization regimes[J]. *European Journal of Soil Science*, 2020, 71 (3): 536—547.
- [11] Hou Q, Zuo T, Wang J, et al. Responses of nitrification and bacterial community in three size aggregates of paddy soil to both of initial fertility and biochar addition[J]. *Applied Soil Ecology*, 2021, 166: 104004.
- [12] Drury C F, Yang X M, Reynolds W D, et al. Influence of crop rotation and aggregate size on carbon dioxide production and denitrification[J]. *Soil and Tillage Research*, 2004, 79 (1): 87—100.
- [13] Hart S C, Stark J M, Davidson E A, et al. Nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification[M]// Weaver R W, Angle S, Bottomley P, et al. Methods of soil analysis: Part 2 Microbiological and biochemical properties. SSSA Book Series. Madison, WI, USA: Soil Science Society of America, 1994: 985—1018.
- [14] Yao H Y, Gao Y M, Nicol G W, et al. Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (13): 4618—4625.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Zhao Z R, Huang G H, He S S, et al. Abundance and community composition of comammox bacteria in different ecosystems by a universal primer set[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 691: 146—155.
- [18] Aigle A, Prosser J I, Gubry-Rangin C. The application of high-throughput sequencing technology to analysis of *amoA* phylogeny and environmental niche specialisation of terrestrial bacterial ammonia-oxidisers[J]. *Environmental Microbiome*, 2019, 14 (1): 3.
- [19] Pester M, Maixner F, Berry D, et al. *NxrB* encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing *Nitrospira*[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(10): 3055—3071.
- [20] Alves R J E, Minh B Q, Urich T, et al. Unifying the global phylogeny and environmental distribution of ammonia-oxidising archaea based on *amoA* genes[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1517.
- [21] Yao X D, Li X G, Ding C F, et al. Microzone distribution characteristics of soil microbial community with peanut cropping system, monocropping or rotation[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56 (4): 975—985. [姚小东, 李孝刚, 丁昌峰, 等. 连作和轮作模式下花生土壤微生物群落不同微域分布特征[J]. *土壤学报*, 2019, 56(4): 975—985.]
- [22] Wu Y L, Zhao X S, Song W F, et al. Effects of peanut and corn planting patterns on soil nutrient and biological characteristics in horqin sandy land[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2022, 50 (5): 48—54, 60. [吴宇伦, 赵雪淞, 宋王芳, 等. 花生和玉米种植模式对科尔沁沙地土壤养分和生物特性的影响[J]. *安徽农业科学*, 2022, 50 (5): 48—54, 60.]
- [23] Yan C B, Zhao Y, Hu F C, et al. Community structure and diversity of soil bacteria in intercropping *Arachis pintoi* under *Areca Catechu* forest[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2022 (2): 42—53. [颜彩缤, 赵亚, 胡福初, 等. 槟榔林下间作平托花生土壤细菌群落结构及多样性研究[J]. *中国土壤与肥料*, 2022(2): 42—53.]
- [24] Li W J, Yang D L, Zhao J N, et al. Progress on effects of long-term continuous cropping and rotation systems on farmland soil biological characteristics[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31 (3): 173—178. [李文娇, 杨殿林, 赵建宁, 等. 长期连作和轮作对农田土壤生物学特性的影响研究进展[J]. *中国农学通报*, 2015, 31 (3): 173—178.]
- [25] Cao L, Qin S H, Zhang J L, et al. Effect of leguminous forage rotations on soil microbe consortiums and enzyme activity in continuously cropped potato fields[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, 22 (3): 139—145. [曹莉, 秦舒浩, 张俊莲, 等. 轮作豆科牧草对连作马铃薯田土壤微生物菌群及酶活性的影响[J]. *草业学报*, 2013, 22 (3): 139—145.]
- [26] Hu H W, Zhang L M, Dai Y, et al. pH-dependent distribution of soil ammonia oxidizers across a large geographical scale as revealed by high-throughput pyrosequencing[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2013, 13 (8): 1439—1449.
- [27] Prosser J I, Nicol G W. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: The quest for niche specialisation and differentiation[J]. *Trends in Microbiology*, 2012, 20 (11): 523—531.
- [28] Walker C B, de la Torre J R, Klotz M G, et al. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (19): 8818—8823.

- [29] Lin Y X, Ye G P, Ding W X, et al. Niche differentiation of comammox *Nitrospira* and canonical ammonia oxidizers in soil aggregate fractions following 27-year fertilizations[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2020, 304: 107147.
- [30] Li P P, Han Y L, He J Z, et al. Soil aggregate size and long-term fertilization effects on the function and community of ammonia oxidizers[J]. *Geoderma*, 2019, 338: 107—117.
- [31] Li Z L, Zeng Z Q, Tian D S, et al. Global patterns and controlling factors of soil nitrification rate[J]. *Global Change Biology*, 2020, 26 (7): 4147—4157.
- [32] Shen X Y, Xia W W, Cirenlamu, et al. Effect of allylthiourea on soil nitrification and the underlying microbial mechanism in short-term laboratory microcosms[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58 (6): 1552—1563. [沈晓忆, 夏围围, 次仁拉姆, 等. 短期培养下抑制剂烯丙基硫脲对土壤硝化作用及微生物的影响[J]. *土壤学报*, 2021, 58 (6): 1552—1563.]
- [33] Hazard C, Prosser J I, Nicol G W. Use and abuse of potential rates in soil microbiology[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2021, 157: 108242.
- [34] Hu H W, Zhang L M, He J Z. Application of nano-scale secondary ion mass spectrometry to microbial ecology study[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(2): 348—357. [胡行伟, 张丽梅, 贺纪正. 纳米二次离子质谱技术 (Nano SIMS) 在微生物生态学研究中的应用[J]. *生态学报*, 2013, 33 (2): 348—357.]

(责任编辑：卢 萍)