

# 不同生育期苹果园土壤氨氧化微生物丰度研究

李景云<sup>1</sup>, 秦嗣军<sup>2</sup>, 葛鹏<sup>1</sup>, 吕德国<sup>2</sup>, 刘灵芝<sup>1\*</sup>

(1 沈阳农业大学土地与环境学院, 沈阳 110866;

2 沈阳农业大学园艺学院/辽宁省果树品质发育与调控重点实验室, 沈阳 110866)

**摘要:**【目的】大量施氮引起的土壤酸化问题已严重制约苹果的安全生产。氨氧化微生物驱动下的土壤硝化作用是土壤氮素循环的重要环节, 探析苹果园土壤中氨氧化微生物氨单加氧酶基因(*amoA*)丰度与土壤硝化强度(Potential Nitrification, PN)和土壤理化性质的相关性, 有助于评价土壤氨氧化微生物类群在苹果园土壤生态系统中的作用。【方法】本研究以辽宁省丹东东港地区‘寒富’苹果园土壤为研究对象, 采用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术, 检测苹果树不同生育时期, 4月28日(萌芽期)、7月24日(新梢停长期)、10月23日(落叶期)的两个苹果园(分别编号为 D1 和 D2)的土壤理化性质、土壤硝化强度、氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)和氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)的 *amoA* 基因丰度, 并分析了氨氧化微生物丰度与土壤理化性质和土壤硝化强度之间的关系。【结果】不同生育时期‘寒富’苹果园土壤理化因子差异较大。所有供试土壤的硝态氮( $\text{NO}_3^-$ -N)、速效磷(AP)和速效钾(AK)含量在4月份最高, 铵态氮( $\text{NH}_4^+$ -N)含量在7月最高,  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NH}_4^+$ -N、AP和AK含量在10月多为最低。且所有供试土壤 pH 值均在 4.25~6.09 之间。同一生育时期内, D2 土壤 pH 均显著高于 D1 土壤, 但其  $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N 含量则不同程度地低于 D1 土壤。不同采样时期的果园土壤硝化强度随季节变化表现出先降后增的趋势, 除 7 月 D2 土壤硝化强度显著高于 D1 土壤外, 4 月与 10 月 D2 土壤硝化强度均显著低于 D1 土壤。尽管不同采样时期的土壤 AOA 与 AOB 丰度随生育期而各异, 所有供试土壤中 AOA 丰度均显著高于 AOB 丰度。同一时期内, D2 土壤 AOA 和 AOB 丰度均显著高于 D1 土壤。尽管土壤 pH、 $\text{NO}_3^-$ -N 与 AOA、AOB 均表现出显著相关性, 土壤 PN 仅与 AOA 丰度明显正相关。【结论】长期施肥导致苹果园土壤 pH 值降低, pH 值的改变是影响 AOA 与 AOB 丰度的重要因子, 果园土壤的硝化过程主要由 AOA 来完成, 土壤硝化强度与季节变化引起的温度和土壤环境因子等的改变密切相关。苹果园无机氮肥混合有机肥的施入, 同时结合自然生草、人工刈割等管理制度, 在一定程度上可改变土壤氮素的含量与种类, 减缓土壤酸化。

**关键词:** 氨氧化微生物; 丰度; 果园酸性土壤; 环境因子; 荧光定量 PCR

中图分类号: S154.54 文献标识码: A 文章编号: 1008-505X(2016)04-1149-08

## Abundance of ammonia oxidizers in apple orchard soil at different growth stages

LI Jing-yun<sup>1</sup>, QIN Si-jun<sup>2</sup>, GE Peng<sup>1</sup>, LÜ De-guo<sup>2</sup>, LIU Ling-zhi<sup>1\*</sup>

(1 College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2 College of Horticulture/Key Lab of Fruit Quality Development and Regulation of Liaoning Province, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**Abstract:** 【Objectives】 Soil acidification caused by over application of N fertilizers has posed a great challenge for apple security production. Nitrification is a central process of soil nitrogen cycle, which is driven by ammonia-oxidizing microorganisms, including ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA). Studying the correlation of the abundance of gene fragment *amoA* with the potential nitrification (PN), as well as the soil physical and chemical properties, will be of help to objective evaluation of soil ammonia-oxidizing

收稿日期: 2015-01-26 接受日期: 2015-04-01 网络出版日期: 2015-12-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101504, 31171917); 中国博士后科学基金项目(2011M500575); 辽宁省高等学校果树栽培与生理生态创新团队(LT2014014); 辽宁省苹果科技创新团队(2014204004); 辽宁省高等学校优秀人才支持计划(LJQ2014070); 沈阳市大型仪器共享服务专项(F14-194-4-00)资助。

作者简介: 李景云(1988—), 女, 河北邯郸人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: lijingyun08@163.com

\* 通信作者 E-mail: liulingzhi2006@163.com

microorganisms in soil ecological system. **【Methods】** Two apple orchards in east of Liaoning Province were used for investigation, in both of the orchards, apple cultivar was ‘hanfu’. In one orchard, the weeds had been removed every year (D1) and in the other the weeds had been cut and returned to soil (D2). Soil samples were collected on April 28<sup>th</sup> (budding period), July 24<sup>th</sup> (young shoot-stop growing period) and October 23<sup>th</sup> (deciduous period). Soil PN and properties were determined, and the abundance of AOA and AOB was measured by real-time PCR using *amoA* gene copies. **【Results】** The highest contents of  $\text{NO}_3^-$ -N, available P and readily available K all appeared in April and those of  $\text{NH}_4^+$ -N in July, the lowest contents of  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N, available P and readily available K were in October in both orchard soils mostly. The pH of all soil samples was in the range from 4.25 to 6.09. The soil pH in D2 was significantly higher than in D1 in the same growth stages, while the  $\text{NO}_3^-$ -N and  $\text{NH}_4^+$ -N contents in D2 were lower than in D1 in different degrees. Soil samples collected in April had the highest PN rates and those collected in July had the lowest rates. Compared to D2, the PN values of D1 groups were significantly higher in April and October, while there were opposite results in July. Although the AOA and AOB abundances changed with the growth stages, the abundances of AOA were significantly higher than the abundances of AOB in all tested soils. In the same period, the AOA and AOB abundances of D2 soils were significantly higher than those of D1 soils, which might be related to soil pH. The correlation analysis showed that there were significant correlations between soil pH,  $\text{NO}_3^-$ -N and AOA and AOB, but the soil PN was only positively correlated with the AOA abundance. **【Conclusions】** The long-term fertilization leads to low soil pH, which is an important factor affecting the abundances of AOA and AOB. The nitrification process in apple orchard soils is mainly related to AOA, and closely related to soil temperature and environmental factors. Fertilization and the returning of mowed weeds affect soil nitrogen contents and forms, slow down the acidification process of orchard soils.

**Key words:** ammonia oxidizer; abundance; orchard acidic soil; environmental factor; real-time PCR

果园土壤长期过量施入氮肥导致土壤硝态氮过量累积问题突出,土壤氮素淋失程度显著高于一般农田土壤<sup>[1]</sup>。辽宁省丹东东港地区自上个世纪90年代初最先开始种植寒富苹果,近年来果园土壤逐渐呈酸化趋势,苹果锰中毒引起的粗皮病<sup>[2]</sup>、果实钙失调等生理障碍发生较重,制约着寒富苹果的优质安全生产。

硝化作用是土壤氮循环的重要环节,由氨氧化微生物(氨氧化细菌, ammonia-oxidizing bacteria, AOB; 氨氧化古菌, ammonia-oxidizing archaea, AOA)参与完成的氨氧化过程是硝化作用的限速步骤,在土壤氮库调节方面起着不可替代的作用<sup>[3]</sup>。氨氧化微生物参与的土壤硝化作用不仅影响果园土壤的进一步酸化,对果园土壤中无机氮素的有效性也具有重要影响。编码参与氨氧化过程主要酶类的氨单加氧酶(AMO)基因 *amoA* 具有较强的保守性,常作为氨氧化微生物的分子标记在许多研究领域被广泛应用<sup>[4]</sup>。研究表明,不同土壤生态系统中 AOA 与 AOB 的种群多样性和 *amoA* 基因丰度存在明显差异<sup>[5-6]</sup>。AOA 多主导酸性土壤中的硝化作用,而 AOB 则主导中性和碱性土壤中的硝化作用<sup>[7]</sup>。由于 AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度及比值与环境因子

密切相关<sup>[8-10]</sup>, Wessén 等<sup>[11]</sup> 提出氨氧化古菌和细菌的 *amoA* 基因丰度可作为生物指标,在一定程度上反映土壤理化因子(氮肥、pH 等)的变化<sup>[12-14]</sup>。与传统清耕制果园土壤环境日趋恶化相比,实行生草制、提倡施加有机肥等对于重建果园土壤健康具有重要意义。本试验针对该区域多年清耕和生草且不同施肥管理的两种土壤管理方式苹果园,在不同生育时期(萌芽期、新梢停长期和落叶期),采用实时荧光定量 PCR 技术,研究果园土壤中氨氧化古菌和氨氧化细菌丰度,结合环境因子与硝化强度分析,以期预警土壤质量变化,科学调控苹果园土壤环境,促进植株生长发育等提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 土壤样品采集及处理

采样地点位于辽宁省丹东地区东港市长山镇七股顶村两个相邻果园,编号分别为 D1 和 D2。果园为浅缓丘陵地,海拔 7 至 20 m,土壤为棕壤。其中, D1 果园自 2001 年栽植寒富苹果,果园土壤采用清耕管理; D2 果园自 1995 年栽植寒富苹果,果园土壤采用自然生草、人工刈割管理。两园施用化肥的时间、种类基本相同,均为每年 4 月上旬以尿素和

磷酸二铵为主配施少量复合肥、6月下旬施复合肥、9月上旬施复合肥和硫酸钾,个别年限还少量施用钙镁硼等肥料。全年氮磷钾施肥量折合: D1 果园 N、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、K<sub>2</sub>O 分别为 485、85、443 kg/hm<sup>2</sup>, D2 果园 N、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、K<sub>2</sub>O 分别为 418、143、300 kg/hm<sup>2</sup>。另外, D1 和 D2 果园于 9 月上旬各撒施少量鸡粪与秸秆堆沤的农家肥 15 t/hm<sup>2</sup> 和 37.5 t/hm<sup>2</sup>。

试验分别于 2012 年 4 月 28 日(萌芽期)、7 月 24 日(新梢停长期)、10 月 23 日(落叶期)采样。取样点位于树冠下,距树干 1.5 m 处。垂直向下取 0—20 cm 的土壤样品,去除表层尚未腐烂的杂草等覆盖物,5 点采样混合处理作为 1 次重复,去除根系和石砾等土壤入侵物,采用“四分法”取 1 kg 土样于 4℃ 冰箱保存备用,每个果园取 3 个重复土样。土壤理化性质测定参照鲍士旦等<sup>[15]</sup>方法。

## 1.2 土壤硝化强度测定

土壤硝化强度的测定参照赵爽等<sup>[16]</sup>的方法:称取 5 g 鲜土样 3 份,分别置于 100 mL 三角瓶中,加 2.5 mL NaClO<sub>3</sub> (75 mmol/L),其中两份在 25℃ 下培养 24 h,另一份置于 -20℃ 冰箱中 24 h 作对照。培养结束后每份加 5 mL 去离子水、10 mL 2 mmol/L KCl 溶液,完全摇匀后立即过滤,吸取 5 mL 滤液放入试管中,加 3 mL NH<sub>4</sub>Cl 缓冲溶液(0.19 mmol/L, pH 8.5)、2 mL 磺胺试剂,摇匀后室温下放置 15 min,520 nm 波长下比色。按以下公式计算:

$$\text{NO}_2^- \text{-N} [\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})] = \frac{(T - C) \times 12.5}{5 \times \text{dwt} \times 24}$$

式中, T 为滤液 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 浓度(mg/g); C 为对照滤液 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 浓度(mg/g); 12.5 为所加入试剂的体积(mL); 5 为所称取土样的重量(g); dwt 表示每克湿土的干重(g); 24 为土样培养时间(h)。硝化强度用单位时间内产生的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的量表示。

## 1.3 土壤微生物总 DNA 提取

土壤微生物 DNA 的提取采用 CWBIO Soil Gen DNA Kit 说明书方法进行。获得 DNA 样品后用微量核酸蛋白质分析仪(Nanodrop2000 UV - Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific)测其浓度,并采用琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA 的质量, -20℃ 保存。

## 1.4 荧光定量 PCR

AOA 和 AOB 的荧光定量 PCR 扩增采用 *amoA* 基因特异引物(表 1)<sup>[17-18]</sup>, 每个样品 3 次重复。采用 SYBR® Premix Ex Taq™(2x) (TakaRa, 大连)试剂盒,在 iCycleriQ 5 thermocyclersystem (Bio-Rad) 扩增仪上进行绝对定量 PCR 分析。荧光定量 PCR 反应体系 20 μL,其中 10 μL SYBR® Premix Ex Taq™(2x),前、后引物各 0.8 μL (10 pmol/μL, 英骏生物工程公司,上海)和 6.4 μL 灭菌超纯水和 2 μL DNA 模板(1~10 ng)。阴性对照采用灭菌双蒸馏水代替 DNA 作为反应模板。定量 PCR 标准曲线采用含有各生育期土壤提取的混合 DNA 为模板进行 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因的克隆进行制备。将含

表 1 AOA 和 AOB 定量 PCR 扩增引物及反应条件

Table 1 Primers and conditions of real-time PCR of AOA and AOB

微生物 Microbe	引物序列 Primer sequence(5' - 3')	片段长度(bp) Fragment length	RT-PCR 程序 Thermal profile for real-time PCR
AOA	Arch-amoAF: TAATGGTCTGGCTTAGACG Arch-amoAR: GCGGCCATCCATCTGTATGT	624 bp	94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1 min, 45 个循环; 溶解曲线温度 55 ~ 95℃, 增加 0.5℃, 0: 05 + 读板 5 min at 94℃, followed by 45 cycles of 94℃ for 30 s, 55℃ for 1 min, 72℃ for 1 min; Melt curve 55 ~ 95℃, 5 s/0.5℃
AOB	amoA - 1F: GGGGTTTCTACTGGTGTT amoA - 2R: CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC	484 bp	94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 45 个循环; 溶解曲线温度 55 ~ 95℃, 增加 0.5℃, 0: 05 + 读板 5 min at 94℃, followed by 45 cycles of 94℃ for 30 s, 53℃ for 30 s, 72℃ for 30 s; Melt curve 55 ~ 95℃, 5 s/0.5℃

有目标基因的克隆在 LB 培养基中过夜培养,提取质粒纯化并测定质粒浓度,根据摩尔常数计算目标基因的拷贝数,并将质粒连续稀释 6~8 个数量级。通过定量 PCR 扩增分别获得 AOA 和 AOB *amoA* 基因标准曲线。其中, AOA 标准曲线的  $R^2$  为 0.99,引物扩增效率为 104.07%; AOB 标准曲线的  $R^2$  为 0.99,引物扩增效率 97.41%。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同生育时期寒富苹果园土壤基本理化性质和硝化强度

不同生育时期寒富苹果园土壤基本理化性质差异明显(表 2)。所有供试土壤样品的 pH 值为 4.25~6.09,土壤呈酸化状态。不同生育时期中,10 月 pH 值最高,7 月较低。在同一生育时期,D1 果园土壤的 pH 值均显著低于 D2 果园土壤。总体上,D1 果园土壤在三个采样时期中,4 月土壤具有较高的  $\text{NO}_3^-$ -N、AP 和 AK 含量,7 月土壤  $\text{NH}_4^+$ -N 含量最高,10 月土壤含水量最高,然而 10 月 D1 果园土壤的  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NH}_4^+$ -N 含量为最低。与 D1 果园土壤相比,D2 果园土壤中  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NH}_4^+$ -N、AP、AK 和含水量指标在 4 月份均显著低于 D1 果园土壤;但 D1 果园与 D2 果园土壤各项指标在 10 月多无明显差

异(除 pH 值和  $\text{NH}_4^+$ -N 外)。与 7 月与 10 月不同,D2 果园土壤的  $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N 含量在 7 月显著低于 D1 果园土壤,而 AP、AK 和 pH 则显著高于 D1 果园土壤。

不同采样时期的果园土壤硝化强度表明,果园土壤硝化强度随季节变化表现出先降后增的趋势(图 1),除 7 月份 D2 果园土壤硝化强度显著高于 D1 果园土壤外,4 月与 10 月 D2 果园土壤硝化强度均显著低于 D1 果园土壤。

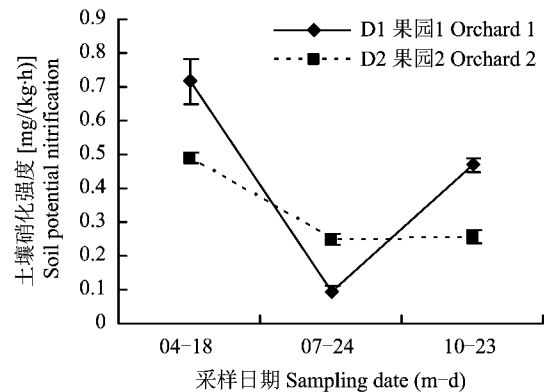


图 1 不同生育时期苹果园土壤硝化强度的变化  
Fig. 1 Potential nitrification of soils at different growth stages of apple

表 2 不同生育时期苹果园土壤理化性质

Table 2 Characteristics of orchard soils at different growth stages of apple

采样时期 Sampling date (m-d)	样品编号 Sample No.	硝态氮 $\text{NO}_3^-$ -N (mg/kg)	铵态氮 $\text{NH}_4^+$ -N (mg/kg)	速效磷 Available P (mg/kg)	速效钾 Available K (mg/kg)	pH ( $\text{H}_2\text{O}$ )	含水量 Water content (%)
4-28	D1	45.45 ± 2.41 a	0.59 ± 0.03 b	433.28 ± 4.46 a	587.59 ± 63.77 a	4.82 ± 0.14 d	21.21 ± 0.37 a
	D2	23.35 ± 0.36 b	0.37 ± 0.05 c	366.04 ± 1.03 b	490.66 ± 7.21 b	5.17 ± 0.13 c	18.14 ± 0.34 b
7-24	D1	30.88 ± 4.24 a	1.10 ± 0.08 a	220.75 ± 7.01 e	250.37 ± 0.99 d	4.25 ± 0.10 e	14.39 ± 1.34 c
	D2	19.91 ± 1.34 b	0.56 ± 0.03 b	310.57 ± 3.06 c	531.22 ± 3.06 ab	5.27 ± 0.01 bc	14.61 ± 1.36 c
10-23	D1	21.92 ± 1.22 b	0.42 ± 0.01 c	294.63 ± 7.19 d	422.75 ± 30.64 c	5.52 ± 0.3 b	22.07 ± 0.29 a
	D2	20.50 ± 2.84 b	0.28 ± 0.01 d	296.19 ± 9.32 d	401.94 ± 48.11 c	6.09 ± 0.02 a	22.53 ± 0.52 a

注(Note): D1—果园 1 Orchard 1; D2—果园 2 Orchard 2. 表中数据为平均值 ± 标准误差,数值后不同字母表示不同采样期处理间差异显著 Data are mean ± standard error. Values followed by different letters indicate significant differences among treatments of different sampling dates ( $P < 0.05$ ).

### 2.2 不同生育期土壤氨氧化微生物种群丰度的变化情况

由图 2 所示,同一采样时期,D2 果园土壤的 AOA 和 AOB *amoA* 基因拷贝数均显著高于 D1 土壤;随生育期延长,D1 果园土壤 AOA *amoA* 基因表

达量呈上升趋势,D2 果园土壤除 4 月显著高于后两个时期,后两个时期无显著差异;D1 果园土壤 AOB *amoA* 基因随生育期延长先增后降,D2 果园土壤却表现出一定的上升趋势。

由图 2 可知,土壤古菌 *amoA* 基因拷贝数的变

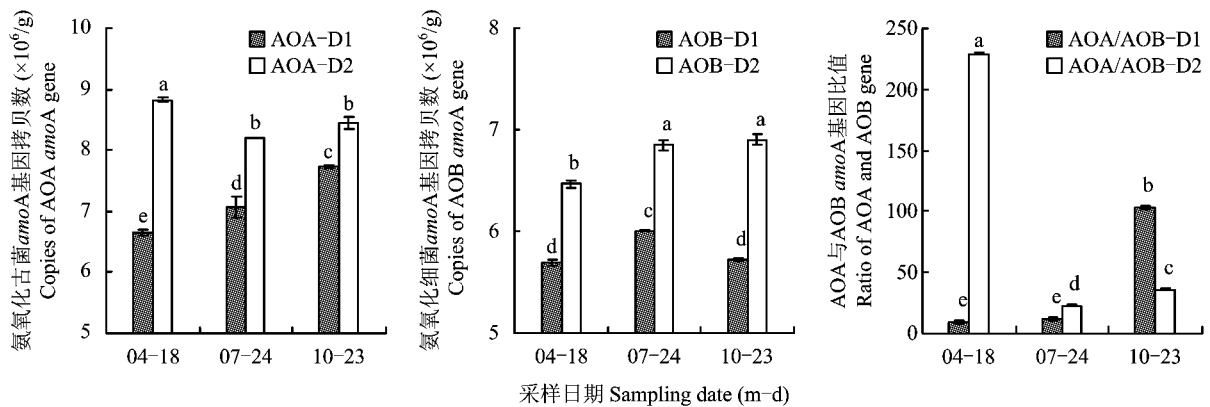


图2 不同生育时期苹果园土壤中氨氧化微生物 *amoA* 基因的丰度与比值

Fig. 2 Abundances and ratios of *amoA* gene of AOA and AOB in soils at different growth stages of apple

[注(Notes): D1—果园1 Orchard 1; D2—果园2 Orchard 2. 方柱上不同字母表示处理间在0.05水平差异显著

Values followed by different letters are significantly different among treatments at 0.05 level. ]

化范围为每克干土  $5.57 \times 10^6 \sim 6.68 \times 10^8$ , 细菌 *amoA* 基因拷贝数的变化范围为每克干土  $5.24 \times 10^5 \sim 7.96 \times 10^6$ 。所有土壤样品中古菌 *amoA* 基因的数量均显著高于细菌, 古菌与细菌的 *amoA* 基因平均拷贝数的比值范围是 8.94 ~ 228.63, 表明在偏酸性果园土壤中 AOA 是氨氧化微生物的主要类群。

### 2.3 不同生育时期氨氧化微生物丰度与土壤硝化强度(PN)和土壤理化性质的相关关系

果园土壤 AOA 丰度与土壤硝化强度显著正相

关(表3), 而 AOB 丰度则无显著相关性。AOA 和 AOB 均与土壤 pH 值呈显著正相关, 而与土壤  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  呈显著负相关, 与速效磷、速效钾和含水量相关性不明显。说明土壤 pH 与  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  含量对土壤氨氧化微生物数量均可产生明显影响, 但与 AOB 相比, AOA 是酸性土壤中硝化作用的主要参与者。此外, 尽管  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  含量与土壤中 AOA 无明显相关性, 却与 AOB 丰度表现出极显著相关性。

表3 氨氧化微生物丰度和土壤硝化强度、理化性质的相关性分析

Table 3 Pearson's correlation coefficients between abundance of ammonia oxidizers and soil potential nitrification and physicochemical properties

项目 Item	硝化强度 PN	硝态氮 $\text{NO}_3^- \text{-N}$	铵态氮 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$	速效磷 Available P	速效钾 Available K	pH	含水量 Water content
AOA	0.482 *	-0.638 **	-0.372	-0.177	0.008	0.516 *	-0.209
AOB	-0.223	-0.809 *	-0.644 **	-0.089	0.032	0.630 *	0.014

注(Notes): PN—土壤硝化强度 Potential nitrification; \*— $P < 0.05$ ; \*\*— $P < 0.01$ .

### 3 讨论

果树不同生育期, 因温度、水分、施肥量等因素的改变, 可导致植株根系分泌物的变化, 进而影响土壤理化性质与土壤微生物种群及其活性的相互关系<sup>[10]</sup>。本研究采用实时荧光定量 PCR 技术研究了不同生育时期寒富苹果园土壤氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)的丰度, 并分析了氨氧化微生物丰度与土壤硝化强度及环境因子之间的相关性。

研究结果显示, 供试果园土壤 pH 范围是 4.25

~ 6.09, 呈酸性状态。众所周知, 苹果为高投资高产产业, 集约化程度较高, 苹果自身的生产特点决定了在其生产过程中必然有大量的肥料投入。姜远茂等对山东苹果园生态系统养分循环计算得出, 中产苹果园( $45 \text{ t/hm}^2$ )化肥投入量 N、 $\text{P}_2\text{O}_5$ 、 $\text{K}_2\text{O}$  分别为 345、196 和 232  $\text{kg/hm}^2$ , 按单位产量吸收养分考量, 果园年盈余氮素最多<sup>[19]</sup>。

大量氮肥施用造成的土壤硝态氮累积、土壤酸化现象将明显影响根系的生理功能, 进而干扰养分和水分的正常吸收<sup>[20]</sup>。供试的两个果园氮素施用

水平超过了山东地区中产园水平,在同一采样时期内,D1 果园土壤的  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  和  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  含量均不同程度地高于 D2 果园土壤,而其 pH 则显著低于 D2 果园土壤。D1 果园土壤中大量氮素的存在,可能是其 pH 值降低的重要因素之一。分析两个果园土壤管理制度可以得知,D1 果园无机氮肥施入量大,有机肥施入量少,且土壤采用清耕管理,而 D2 果园无机氮肥施用量相对少,而有机肥施用量大,且土壤采用了自然生草、人工刈割管理,这可能是 D2 果园在一定程度上改变土壤氮素的含量与种类,减缓了土壤酸化过程的重要原因。此外,长期施肥产生的土壤酸化现象,可引起钙、钾、钼、镁、锰等营养元素的固定、流失,造成土壤贫瘠化,进而影响果树生长、导致果树各类病害的产生。本研究两个供试果园中,pH 值较低的 D1 果园果树粗皮病现象明显高于 D2 果园,该结果与前人报导土壤酸化可导致二价锰离子析出引起果树粗皮病相一致<sup>[21-23]</sup>。

试验中,各采样时期果园土壤中硝态氮含量均远高于铵态氮,表明取样时期土壤硝化作用已趋于完成,然而研究中 AOA 和 AOB 的氨单加氧酶基因丰度仍存在着季节差异,分析其原因可能与氨氧化微生物种群、数量及活性受多种环境因子调控相关,Shen 等<sup>[24]</sup>指出,大区域尺度上,pH 值是驱动氨氧化微生物多样性分布及活性的主要因子,土壤 pH 值、含水量等因素对微生物群落的影响较土壤碳、氮含量变化更为明显。本研究中,果园以自然降雨生产为主,同期相邻果园土壤含水量基本相同,而年内 pH 存在一定的变化幅度(D1  $4.86 \pm 0.64$ ; D2  $5.50 \pm 0.50$ ),其可能与 AOA 与 AOB 变化有关。荧光定量 PCR 结果显示,所有供试寒富苹果园土壤中,AOA 丰度均显著高于 AOB 丰度,二者相差 1 ~ 2 个数量级,*amoA* 基因拷贝数比值最高可达 228.63。该结果进一步证实了土壤生态系统中 AOA 拥有更高的数量<sup>[6,25]</sup>。此外,AOA 与 AOB 丰度随果树生育期及采样园区不同而各异,该变化可能因其对土壤温度、pH 值的敏感程度不同,进而表现出不同的响应模式。本研究中,土壤 pH 与 AOA ( $r=0.516, P<0.05$ ) 和 AOB ( $r=0.630, P<0.05$ ) 丰度均表现为显著相关,说明土壤 pH 是影响氨氧化微生物丰度的重要因子,且 AOB 对 pH 的敏感程度略高于 AOA。

另外,苹果园土壤 AOA 丰度与土壤潜在硝化强度(PN)呈显著正相关,AOB 丰度则与 PN 无明显相关性。该结果进一步表明酸性土壤中 AOA 是土壤

硝化作用的主要贡献者。Zhang 等和 Wang 等研究茶园土壤和红壤等生态系统,亦指出酸性土壤中氨氧化古菌较细菌在土壤微生物组成及其生态系统功能中发挥着更重要的作用<sup>[7,25-26]</sup>。通常认为,氨单加氧酶 AMO 直接底物是氨( $\text{NH}_3$ ),而不是铵离子( $\text{NH}_4^+$ )。酸性土壤中  $\text{NH}_4^+$  含量高并不一定意味着可利用底物  $\text{NH}_3$  含量也高(根据公式  $\text{NH}_3 + \text{H}^+ = \text{NH}_4^+$ ,  $\text{pKa} = 9.25, 25^\circ\text{C}$ )<sup>[27]</sup>,因此,在低 pH 值的环境中可利用氨含量理论值显著低于 AOB 的培养阈值,但可能有利于对氨具有较高亲和力的 AOA 的生存<sup>[28]</sup>。大量研究证实,在不同土壤环境中,AOA 和 AOB 对土壤氨氧化作用发挥的作用不同,二者因氮素含量和 pH 而占据不同生态域<sup>[29]</sup>。AOA 较 AOB 更适应可利用铵态氮浓度较低的环境条件,并在硝化过程中起到了主导作用<sup>[4,30]</sup>,与之相反,AOB 则多主导碱性和氮素丰度较高的中性土壤的硝化过程<sup>[31]</sup>。本研究中,土壤  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  与 AOA 丰度( $r = -0.638, P < 0.01$ ) 和 AOB 丰度( $r = -0.809, P < 0.01$ ) 均存在显著负相关,土壤  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  则仅与 AOB 丰度( $r = -0.644, P < 0.01$ ) 表现出显著负相关。该结果在一定程度上反映出土壤酸化导致铵态氮含量的变化对 AOB 丰度的影响更为明显。另外,本研究仅对年内不同生育期氨氧化微生物的变化做了初步检测,而年际间各生育期氨氧化微生物丰度变化如何? 其与环境因子的关系如何? 应进一步深入探析氨氧化微生物在土壤氮素转化中的作用。

氨氧化微生物的硝化潜能、土壤氮素养分有效性以及果树氮素养分吸收利用三者之间相互作用,密切相关。微生物合成的胞外酶是调控氮素转化的重要因素,施肥处理、不同生育时期根系生理活性及土壤环境因子的差异都将形成不同功能的微生物群落,从而改变土壤脲酶、磷酸酶和蛋白酶等的合成与活性,干扰氮转化的酶调控过程<sup>[32]</sup>。一些报道认为,苹果是喜硝植物,尽管一些施肥处理整体上可以增加土壤氨氧化细菌的数量,与 AOB 相比,不论有机肥、无机肥单独施用还是配施,AOA 多为土壤硝化作用的优势类群<sup>[33]</sup>。因此,在果树根系-硝化微生物-果园土壤氮循环系统中,长期或过量施用氮素养分直接或间接地改变根际环境,影响了氨氧化微生物的种群结构组成与活性,进而影响了植株根系对氮素吸收利用。由于 AOA 和 AOB 分别主导不同 pH 条件下土壤氮代谢的转化过程,而果园 pH 值与施肥及土壤管理等有密切的关系。因此,通过检测 AOA 与 AOB 种群结构、基因丰度与硝化活性

的变化,作为潜在的土壤环境预测指标,分析氮肥施入与土壤酸化的关系,可为科学调控果园投入氮肥种类、数量,减缓土壤酸化,维持果园肥力提供参考依据。

## 4 结论

不同生育时期‘寒富’苹果园土壤理化性状、氨氧化微生物丰度及土壤硝化强度均表现出不同程度的差异。苹果园土壤受长期施肥影响逐渐呈酸化趋势, AOA 是苹果园土壤硝化作用的优势类群,与土壤 pH 值变化呈显著正相关。土壤硝化强度受多种土壤环境因子的调控,苹果园无机氮肥混合有机肥的施入,同时自然生草、人工刈割等管理制度,可在一定程度上改变土壤 AOA 与 AOB 的丰度与比例,以及土壤氮素的含量与种类,减缓土壤酸化。

## 参考文献:

- [1] 王艳萍,高吉喜,刘尚华,等. 有机肥对桃园土壤硝态氮分布的影响[J]. 应用生态学报, 2008, 19(7): 1501-1505.  
Wang Y P, Gao J X, Liu S H, *et al.* Effects of organic manure on the profile distribution of soil nitrate-N in a peach orchard [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(7): 1501-1505.
- [2] 姜学玲,于忠范,张广和. 胶东苹果粗皮病发生原因及防治技术初探[J]. 落叶果树, 1998, (1): 36-38.  
Jiang X L, Yu Z F, Zhang G H. The reasons and countermeasures of internal bark necrosis in apple tree in Jiaodong area [J]. Deciduous Fruits, 1998 (1): 36-38.
- [3] 李顺鹏. 环境生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.  
Li S P. Environmental biology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002.
- [4] 刘晶静,吴伟祥,丁颖,等. 氨氧化古菌及其在氮循环中的重要作用[J]. 应用生态学报, 2010, 21(8): 2154-2160.  
Liu J J, Wu W X, Ding Y, *et al.* Ammonia-oxidizing archaea and their important roles in nitrogen biogeochemical cycling [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2010, 21(8): 2154-2160.
- [5] Könneke M, Bernhard A E, de la Torre J R, *et al.* Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon [J]. Nature, 2005, 437: 543-546.
- [6] Leininger S, Urlich T, Schloter M, *et al.* Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils [J]. Nature, 2006, 442: 806-809.
- [7] Shen J P, Xu Z H, He J Z. Frontiers in the microbial processes of ammonia oxidation in soils and sediments [J]. Journal of Soils Sediments, 2014, 14: 1023-1029.
- [8] Long X, Chen C R, Xu Z H, *et al.* Abundance and community structure of ammonia oxidizing bacteria and archaea in a Sweden boreal forest soil under 19-year fertilization and 12-year warming [J]. Journal of Soils Sediments, 2012, 12: 1124-1133.
- [9] Ollivier J, Wanat N, Austruy A, *et al.* Abundance and diversity of ammonia-oxidizing prokaryotes in the root-rhizosphere complex of *Miscanthus giganteus* grown in heavy metal-contaminated soils [J]. Microbial Ecology, 2012, 64: 1038-1046.
- [10] Sher Y, Zaady E, Nejidat A. Spatial and temporal diversity and abundance of ammonia oxidizers in semi-arid and arid soils: indications for a differential seasonal effect on archaeal and bacterial ammonia oxidizers [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 86, 544-556.
- [11] Wessén E, Hallin S. Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers-Possible bio-indicator for soil monitoring [J]. Ecological Indicators, 2011, 11: 1696-1698.
- [12] Nicol G W, Leininger S, James I. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10 (11): 2966-2978.
- [13] Hu B L, Liu S A, Shen L D, *et al.* Effect of different ammonia concentrations on community succession of ammonia-oxidizing microorganisms in a simulated paddy soil column [J]. PLOS ONE, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0044122
- [14] Wan R, Wang Z, Xie S G. Dynamics of communities of bacteria and ammonia-oxidizing microorganisms in response to simazine attenuation in agricultural soil [J]. Science of the Total Environment, 2014, 472: 502-508.
- [15] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.  
Bao S D. Soil and agro-chemistry analysis [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000.
- [16] 赵爽,胡江,沈其荣. 两个水稻品种根际土壤细菌和氨氧化细菌的群落结构差异[J]. 土壤学报, 2010, 47(5): 939-945.  
Zhao S, Hu J, Shen Q R. Difference in community structure of bacteria and ammonia-oxidizing bacteria in rhizosphere between two different rice cultivars [J]. Acta Pedologica Sinica, 2010, 47 (5): 939-945.
- [17] Francis C, Roberts K, Beman J, *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 USA, 2005, 102: 14683-14688.
- [18] Rothhauwe 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 Environmental Microbiology, 1997, 63: 4704-4712.
- [19] 姜远茂,张宏彦,张福锁. 北方落叶果树养分资源综合管理理论与实践[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2007.  
Jiang Y M, Zhang H Y, Zhang F S. Theory and practice in nutrient resources management of the deciduous fruit trees in northern China [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2007.
- [20] 张福锁,曹一平. 根际微生态系统养分有效性及植物适应性机理[J]. 土壤, 1993, (5): 260-262.  
Zhang F S, Cao Y P. Adaptive mechanism of rhizosphere micro-ecosystem nutrient availability and plant [J]. Soils, 1993, 260-

- 262.
- [21] 叶优良, 张福锁, 于忠范, 等. 苹果粗皮病与锰含量的关系 [J]. 果树学报, 2002, 19(4): 219-222.  
Ye Y L, Zhang F S, Yu Z F, *et al.* Study on the relationship between leaf content of manganese and internal bark necrosis disease of apple trees [J]. *Journal of Fruit Science*, 2002, 19(4): 219-222.
- [22] 徐圣友, 姚青, 王贺, 等. 对锰害敏感性不同的两个苹果品种枝条中锰的积累与分布 [J]. 园艺学报, 2003, 30(1): 19-22.  
Xu S Y, Yao Q, Wang H, *et al.* Accumulation and distribution of manganese in shoots of apple cultivars with different sensitivity to manganese [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30(1): 19-22.
- [23] 徐圣友, 张福锁, 王贺, 等. 环境因子对苹果粗皮病发生的影响 [J]. 果树学报, 2008, 25(1): 73-77.  
Xu S Y, Zhang F S, Wang H, *et al.* Effects of environmental factors on internal bark necrosis of apple trees [J]. *Journal of Fruit Science*, 2008, 25(1): 73-77.
- [24] Shen J P, Zhang L M, Di H J, *et al.* A review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chinese soils [J]. *Front Microbiology*, 2012, 3: 296.
- [25] Zhang L M, Hu H W, Shen J P, *et al.* Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils [J]. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 2012, 6: 1032-1045.
- [26] Wang B Z, Zheng Y, Huang R, *et al.* Active ammonia oxidizers in an acidic soil are phylogenetically closely related to neutrophilic archaeon [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(5): 1684-1691.
- [27] Suzuki I, Dular U, Kwok S C. Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by nitrosomonase uropaea cells and extracts [J]. *Journal of Bacteriology*, 1974, 120: 556-558.
- [28] Stopnisek N, Gubry-Rangin C, Hofferle S, *et al.* Thaumarchaeal ammonia oxidation in an acidic forest peat soil is not influenced by ammonium amendment [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2010, 76: 7626-7634.
- [29] He J Z, Hu H W, Zhang L M. Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 55: 146-154.
- [30] Hatzenpichler R, Lebecleva E V, Spieck E, *et al.* A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2008, 105: 2134-2139.
- [31] Di H J, Cameron K C, Shen J P, *et al.* Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen rich grassland soils [J]. *Nature Geoscience*, 2009, 2: 621-624.
- [32] Jan M T, Roberts P, Tonheim S K, *et al.* Protein breakdown represents a major bottleneck in nitrogen cycling in grassland soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41: 2272-2282.
- [33] Hai B, Diallo N H, Sall S, *et al.* Quantification of key genes steering the microbial nitrogen cycle in the rhizosphere of sorghum cultivars in tropical agroecosystems [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15): 4993-5000.