

长期施肥对棕壤氨氧化细菌和古菌丰度的影响

罗培宇^{1,2}, 樊耀^{1,2,3}, 杨劲峰^{1,2}, 葛银凤^{1,2}, 蔡芳芳^{1,2}, 韩晓日^{1,2*}

(1 沈阳农业大学土地与环境学院, 辽宁沈阳 110866; 2 土壤肥料资源高效利用国家工程实验室, 辽宁沈阳 110866;
3 金正大生态工程集团股份有限公司, 山东临沂 276700)

摘要:【目的】氨氧化是氮转化过程的限速步骤, 其由氨氧化微生物所驱动。本研究旨在探明 37 年玉米-大豆轮作施肥条件下影响棕壤氨氧化微生物丰度的主要影响因子及变化规律。【方法】以沈阳农业大学棕壤肥料长期定位试验耕层土壤 (0—20 cm) 为材料, 选取其中 9 个施肥处理进行取样分析: 不施肥 (CK)、低量氮肥 (N₁)、高量氮肥 (N₂)、氮磷肥 (N₁P)、氮磷钾肥 (N₁PK)、高量有机肥 (M₂)、高量有机肥 + 低量氮肥 (M₂N₁)、高量有机肥 + 氮磷肥 (M₂N₁P)、高量有机肥 + 氮磷钾肥 (M₂N₁PK)。采用实时荧光定量 PCR 技术测定其氨氧化微生物丰度, 通过对土壤基本化学性质和氨氧化微生物丰度的冗余分析找出影响氨氧化微生物丰度的主要因素。【结果】施用有机肥处理的土壤 pH、有机质、全氮、碱解氮、速效钾、速效磷、铵态氮、硝态氮含量明显高于不施肥和单施化肥处理。各施肥处理土壤有机质、全氮、碱解氮、速效钾、速效磷的含量总体呈现有机肥处理 > 化肥处理 > CK; 与不施肥处理 (CK) 相比, 单施化肥处理显著降低了土壤 pH 值, 施用有机肥处理显著提高了土壤 pH 值, 其中 N₂ 处理的土壤 pH 最低, M₂ 处理的土壤 pH 最高。不同施肥处理氨氧化细菌 (AOB) 的丰度为 $0.94 \times 10^6 \sim 5.77 \times 10^6$ copies/g 干土, 氨氧化古菌 (AOA) 的丰度为 $3.56 \times 10^6 \sim 1.22 \times 10^7$ copies/g 干土; 施用有机肥处理 AOB 和 AOA 丰度显著高于不施肥和单施化肥处理, 其中 M₂ 处理的 AOB 和 AOA 丰度最高, 单施氮肥处理的 AOB 和 AOA 丰度最低。冗余分析 (RDA) 表明, 影响棕壤 AOB 和 AOA 丰度的主要环境因子有土壤 pH、有机质、全氮、碱解氮、速效磷、速效钾, 且与 AOB 和 AOA 丰度呈正相关关系。【结论】长期轮作施肥显著改变了棕壤的化学性质, 从而对氨氧化微生物的丰度产生了显著影响。长期施用有机肥显著提高了土壤养分含量及 AOB 和 AOA 的丰度, 对维持土壤氨氧化微生物的数量起到十分重要的作用; 同时试验结果也为今后通过改变土壤 pH、有机质、全氮、碱解氮、速效磷、速效钾等性质对 AOB 和 AOA 进行调节提供了依据。

关键词: 棕壤; 定位试验; 长期施肥; 氨氧化微生物; 丰度

Influence of long-term fertilization on abundance of ammonia oxidizing bacteria and archaea in brown soil

LUO Pei-yu^{1,2}, FAN Yao^{1,2,3}, YANG Jin-feng^{1,2}, GE Yin-feng^{1,2}, CAI Fang-fang^{1,2}, HAN Xiao-ri^{1,2*}

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

2 National Engineering Laboratory of High Efficient Use on Soil and Fertilizer Resources, Shenyang 110866, China;

3 Kingenta Ecological Engineering Group Co., Ltd., Linyi, Shandong 276700, China)

Abstract: 【Objectives】Ammonia-oxidation, driven by the ammonia-oxidizing microorganisms, is a rate-limiting step of nitrogen transformation processes. The aim of this study was to explore the main factors which influenced abundance of ammonia-oxidizing microorganisms under a corn-soybean rotation system and a long-term fertilization for 37 years in a brown soil. 【Methods】Soil samples (0–20 cm) were collected from the nine treatments of the long-term fertilization trial: no fertilization (CK), low chemical N input (N₁), high chemical N input (N₂), chemical N and P input (N₁P), chemical N, P and K input (N₁PK), pig manure (M₂), pig manure and chemical N (M₂N₁), pig manure, chemical N and P (M₂N₁P) and pig manure, chemical N, P and K (M₂N₁PK). The

收稿日期: 2016-08-29 接受日期: 2016-10-10

基金项目: 国家自然科学基金 (31471940, 41501305) 资助。

作者简介: 罗培宇 (1982—), 男, 湖南邵阳人, 博士, 讲师, 主要从事土壤养分循环和土壤微生物方面的研究。

E-mail: ibtyoufe@163.com. *通信作者 E-mail: hanxr@163.com

abundance values of ammonia-oxidizing microorganisms were analyzed using qPCR methods. Main factors influencing the abundance of ammonia-oxidizing microorganisms were found out by the redundancy analysis (RDA) of soil chemical properties and the abundance of ammonia-oxidizing microorganisms. 【 Results 】 The pH, the soil contents of organic matter, total N, alkali-hydrolysable N, available K, available P, ammonium and nitrate in the organic fertilizer treatments were significantly higher than those in the CK and chemical fertilizer treatments. The soil organic matter, alkali-hydrolysable N, available K, available P and total N was in order of manure treatments > chemical fertilizer treatments > CK. Compared with the CK, the pure chemical fertilization decreased soil pH, while the manure application increased soil pH. The pH values of soil were the lowest in one with the N₂ treatment and the highest in the M₂ treatment. The abundances of ammonia oxidizing bacteria (AOB) were $0.94 \times 10^6 - 5.77 \times 10^7$ copies/g dry soil, and the abundances of ammonia oxidizing archaea (AOA) were $3.56 \times 10^6 - 1.22 \times 10^7$ copies/g dry soil in different fertilization treated soils, respectively. The abundances of AOB and AOA in manure treatment soils were significantly higher than those in the CK and chemical fertilizer treatment soils. The abundances of AOB and AOA treated with the manure were the highest, while the abundances of AOB and AOA only treated with the chemical nitrogen were the lowest. The redundancy analysis showed that the main factors which affected the abundances of AOB and AOA were soil pH, organic matter, alkali-hydrolysable N, available P and available K, and these factors had positive correlations with the abundances of AOB and AOA. 【 Conclusions 】 The long-term fertilization under a rotation influenced the abundances of ammonia-oxidizing microorganisms most likely by significantly changing the chemical properties of brown soil. The long-term application of organic fertilizer improved soil nutrient contents and played an important role in maintaining the abundances of ammonia-oxidizing microorganisms in brown soil. Simultaneously, the results provide a basis for regulating abundances of AOA and AOB by changing the pH values, the contents of organic matter, total nitrogen, alkali-hydrolysable nitrogen, available phosphorus and available potassium in the future.

Key words: brown soil; located trial; long-term fertilization; ammonia oxidation microorganism; abundance

土壤微生物作为农田土壤的重要组成部分, 在土壤养分转化、元素循环以及有机质的分解过程中起着重要作用。作为评价土壤质量、维持土壤肥力的重要指标, 土壤微生物一直倍受关注^[1]。氨氧化微生物是硝化作用的关键微生物, 在全球氮循环过程中起着至关重要的作用^[2-3]。作为理想的模式微生物, 氨氧化微生物的丰度和群落多样性已经成为衡量土壤环境变化的重要指标之一^[1]。长期施用肥料能改变土壤微生物活性及丰度^[4], 研究长期施肥对土壤氨氧化微生物群落结构多样性和丰度的影响已有众多报道, 如 He 等^[5]研究了长期施肥对旱地红壤氨氧化微生物群落组成和丰度的影响; 辛亮等^[6]研究了长期施肥对旱地土壤中氨氧化微生物丰度和分布的影响。然而不同土地利用方式^[7-10]、不同作物种类^[11]、不同施肥方式^[12-15]均会对土壤氨氧化微生物群落多样性和丰度产生显著影响, 进而使得 AOA 和 AOB 对土壤硝化作用的响应及其在群落生态功能中的相对贡献不同^[16]。采用分子生物学技术对环境微生物的深入研究, 促进了环境微生物分子生态学的发展^[17], 实时荧光定量 PCR 技术以其高灵敏性、高特异性、高

精确度、实时性、污染少等优点, 在微生物生态学的研究中逐渐得到众多学者的认可^[18]。虽然有关氨氧化微生物多样性和丰度的研究相对较多, 不同的土壤类型氨氧化微生物的群落结构和丰度均有相似的结论, 但是由于氨氧化微生物对不同施肥条件及不同耕作模式响应有所差别, 因此, 本研究在棕壤长达 37 年玉米-大豆长期轮作施肥的基础上, 采用 Real-time PCR 技术研究长期有机肥配施化肥和单施化肥处理对棕壤氨氧化微生物丰度的影响, 以期探讨不同施肥处理棕壤氨氧化微生物丰度的变化, 及影响氨氧化微生物丰度的主要影响因子, 从而为进一步研究硝化抑制剂、调控土壤硝化作用以及氮素转化机理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况及试验设计

供试土壤样品采自沈阳农业大学棕壤肥料长期定位试验地 (北纬 40°48', 东经 123°33')。该试验地始于 1979 年, 到 2015 年已有 37 年历史, 采用玉米-

玉米-大豆轮作, 2015 年种植玉米。土壤为发育于第四纪黄土性母质上的筒育湿润淋溶土(耕作棕壤)。该地处于松辽平原南部中心地带, 属温带湿润-半湿润季风气候, 年降雨量为 574~684 mm, 年蒸发量为 1435.6 mm, 平均气温为 7.0~8.1℃, 无霜期为 140~180 d, 降雨多集中在 7~8 月份。1979 年原始土壤理化性质为 pH 6.50、碱解氮 105.5 mg/kg、速效磷 6.50 mg/kg、速效钾 97.9 mg/kg、有机质 15.90 g/kg、全氮 0.80 g/kg、全磷 0.38 g/kg 及全钾 21.10 g/kg。

试验地设化肥区、低量有机肥区和高量有机肥区 3 区组, 共计 15 个处理。本试验选取其中 9 个处理: 不施肥 (CK)、低量氮肥 (N₁)、高量氮肥 (N₂)、氮磷肥 (N₁P)、氮磷钾肥 (N₁PK)、高量有机肥 (M₂)、高量有机肥 + 低量氮肥 (M₂N₁)、高量有机肥 + 氮磷肥 (M₂N₁P)、高量有机肥 + 氮磷钾肥 (M₂N₁PK)。所有肥料作为基肥在播种前一次性施入土壤。有机肥为猪厩肥, 平均含有机质 119.6 g/kg, 全 N 5.6 g/kg, P₂O₅ 8.3 g/kg, K₂O 10.9 g/kg。各处理施肥量如表 1 所示。

1.2 土壤样品采集及前处理

土壤样品在 2015 年播种前 (4 月 21 日) 进行采集, 各处理随机选取 5 个点, 采样深度为 0—20 cm, 充分混匀, 剔除砾石、植物根系等杂物, 过 1 mm 筛, 一部分测定铵态氮、硝态氮及提取土壤总 DNA 并采用实时荧光定量 PCR 技术测定其氨氧化微

生物丰度; 另一部分风干后测定土壤 pH、有机质、全氮、碱解氮、速效钾、速效磷。另外分别在苗期 (5 月 31 日)、拔节期 (6 月 28 日)、抽雄期 (7 月 27 日) 和收获期 (9 月 20 日) 采取土样测定氨氧化微生物的丰度。

1.3 测定方法

土壤总 DNA 提取: 采用 PowerSoil™ DNA 提取试剂盒 (Mobio Laboratories, Inc., USA) 提取, DNA 样品于 -20℃ 冰箱中保存待用。土壤基本化学性质分析采用常规分析法^[19]。

氨氧化细菌和氨氧化古菌丰度分析: 以氨氧化细菌 *amoA* 基因和氨氧化古菌 *arch-amoA* 基因的拷贝数分别表示氨氧化细菌和氨氧化古菌的丰度。利用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术检测 *amoA* 和 *arch-amoA* 基因拷贝数。每个样品重复 3 次, PCR 引物和扩增条件如李景云等所述^[20]。Real-time PCR 反应体系为 20 μL, 其中 DNA 模板 2 μL, 18 μL 为反应液, 反应液包括 10 μL SYBR、上下游引物各 0.8 μL、超纯水 6.4 μL。

1.4 数据分析

图表制作采用 Microsoft Office Excel 2007, 方差分析采用 SPSS 19.00, 采用最小显著差数法 ($\alpha = 0.05$, LSD) 进行单因素方差分析, 冗余分析采用 CANOCO 4.5。

2 结果与分析

2.1 不同施肥处理对土壤理化性质的影响

不同施肥处理土壤的部分化学性质见表 2, 各施肥处理间差异性显著。施用有机肥处理土壤 pH、有机质、全氮、碱解氮、速效磷、速效钾显著高于不施肥和单施化肥处理。其中, 土壤有机质、碱解氮、速效钾、速效磷、全氮的各施肥处理总体趋势为有机肥各处理 > 化肥处理 > CK。与不施肥处理 (CK) 相比, 单施化肥土壤 pH 值下降, 施用有机肥处理土壤 pH 均有所提高, 其中单施氮肥土壤 pH 最低, 单施有机肥土壤 pH 最高。说明施用有机肥能显著提高土壤 pH, 同时也能提高土壤养分含量, 而不平衡施肥则使土壤条件恶化。

2.2 不同施肥处理对土壤铵态氮、硝态氮的影响

如图 1 所示, 长期施用有机肥土壤铵态氮的含量高于不施肥和单施化肥处理, 且变化幅度较小。与不施肥处理 CK (平均值为 12.4 mg/kg) 相比, 只有

表 1 各施肥处理玉米/大豆季肥料施用量

Table 1 Application rates of fertilizer in maize/soybean season of the treatments

| 处理 Treatment | 化肥 Chemical fertilizer (kg/hm ²) | | | 猪厩肥 (t/hm ²) Pig manure |
|----------------------------------|--|-------------------------------|------------------|--|
| | N | P ₂ O ₅ | K ₂ O | |
| N ₁ P | 120/30 | 60/90 | 0/0 | 0/0 |
| N ₁ PK | 120/30 | 60/90 | 60/90 | 0/0 |
| N ₁ | 120/30 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| N ₂ | 180/60 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| CK | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| M ₂ N ₁ P | 120/30 | 60/90 | 0/0 | 27.0/0 |
| M ₂ N ₁ PK | 120/30 | 60/90 | 60/90 | 27.0/0 |
| M ₂ N ₁ | 120/30 | 0/0 | 0/0 | 27.0/0 |
| M ₂ | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 27.0/0 |

注 (Note): 长期定位试验始于 1979 年, 采用玉米-玉米-大豆轮作制度, 每 3 年重复 1 次 The long-term fertilization started since 1979, the rotation system was maize-maize-soybean, the rotation was repeated every three years.

表 2 供试土壤基本化学性质
Table 2 Basic chemical properties of the tested soil

| 处理 Treatment | 有机质 (g/kg) SOM | 碱解氮 (mg/kg) Alk.-hydr. N | 速效钾 (mg/kg) Avail. K | 速效磷 (mg/kg) Avail. P | 全氮 (g/kg) Total N | pH |
|----------------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|---------------|
| CK | 15.6 ± 0.03 g | 74.8 ± 0.88 i | 107.1 ± 0.80 d | 1.30 ± 0.10 g | 0.83 ± 0.01 f | 4.96 ± 0.03 e |
| N ₁ P | 16.0 ± 0.01 f | 86.8 ± 0.44 e | 89.4 ± 0.50 f | 9.95 ± 0.16 f | 0.85 ± 0.02 ef | 4.67 ± 0.01 f |
| N ₁ PK | 16.3 ± 0.04 e | 76.7 ± 0.24 h | 126.1 ± 0.80 b | 15.2 ± 0.20 e | 0.88 ± 0.01 de | 4.49 ± 0.04 g |
| N ₁ | 15.9 ± 0.03 f | 75.1 ± 0.32 hi | 96.0 ± 0.30 e | 1.86 ± 0.10 g | 0.88 ± 0.01 d | 4.36 ± 0.02 h |
| N ₂ | 15.0 ± 0.03 h | 81.9 ± 0.82 f | 97.0 ± 0.60 e | 1.80 ± 0.16 g | 0.83 ± 0.02 f | 4.20 ± 0.01 i |
| M ₂ N ₁ P | 20.8 ± 0.03 c | 111.9 ± 0.13 c | 116.7 ± 0.30 c | 65.5 ± 0.20 b | 1.20 ± 0.03 b | 5.06 ± 0.04 d |
| M ₂ N ₁ PK | 21.4 ± 0.03 a | 100.3 ± 0.90 d | 144.1 ± 0.60 a | 78.7 ± 0.40 a | 1.24 ± 0.01 a | 5.16 ± 0.03 c |
| M ₂ N ₁ | 20.6 ± 0.05 d | 122.5 ± 0.79 a | 116.1 ± 0.30 c | 56.7 ± 0.20 c | 1.20 ± 0.02 b | 5.26 ± 0.04 b |
| M ₂ | 20.9 ± 0.02 b | 117.0 ± 0.67 b | 115.1 ± 0.30 c | 43.7 ± 0.20 d | 1.17 ± 0.01 c | 5.79 ± 0.04 a |

注 (Note): 同一列数据后不同字母表示差异显著 (LSD 法, $\alpha = 0.05$) Values followed by different letters in the same column are significantly different among the treatments (LSD method, and $\alpha = 0.05$).

N₁、N₁PK 处理土壤中铵态氮含量有所下降, 分别为 10.52 mg/kg 和 10.46 mg/kg, 其余各施肥处理土壤铵态氮含量均有不同程度的增加。施用有机肥的 3 个处理 (M₂N₁P、M₂N₁PK、M₂N₁) 与 CK 相比, 分别提高了 18.1%、14.8%、15.1%, 且差异性显著, 这说明长期施用有机肥有利于提高土壤铵态氮的含量, 为作物生长发育提供充足的氮源。

不同施肥处理土壤硝态氮含量差异性显著 (图 1)。各施肥处理间土壤硝态氮的含量趋势为有机肥区 > 化肥区 > CK。其中, 施用有机肥的 4 个处理 (M₂N₁P、M₂N₁PK、M₂N₁、M₂) 与 CK (平均值为 8.32 mg/kg) 相

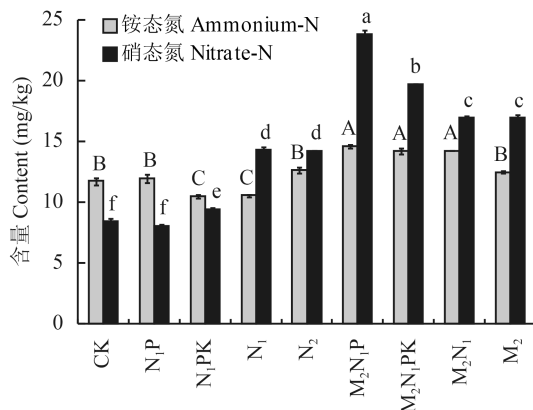


图 1 不同施肥处理土壤铵态氮、硝态氮含量

Fig. 1 Contents of soil ammonium and nitrate nitrogen in different treatments

[注 (Note): 误差线为标准误差, 大写字母代表铵态氮的差异性, 小写字母代表硝态氮的差异性 Error bars indicate one standard error, capital letters represent differences of NH₄⁺-N, and lower case letters represent differences of NO₃⁻-N ($\alpha = 0.05$).]

比差异较大, 分别提高了 189.2%、136.8%、102.2%、103.0%, 单施化肥土壤硝态氮含量也有不同程度的增加, 说明长期施肥 (尤其施用有机肥) 能显著提高土壤硝态氮的含量。这可能是由于有机肥处理土壤 AOB 和 AOA 丰度较大, 会促进土壤硝化作用增强, 导致硝态氮含量显著提高。这与袁颖红等^[21]的研究结果相似。

2.3 不同施肥处理氨氧化微生物的丰度

由图 2 可以看出, 各施肥处理土壤中氨氧化古菌的丰度明显高于氨氧化细菌, 且不同施肥处理间氨氧化微生物丰度差异性显著。施用有机肥处理土

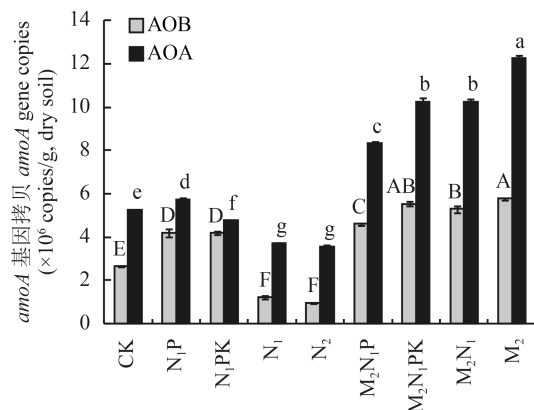


图 2 不同施肥处理 AOB 和 AOA 丰度

Fig. 2 Abundances of ammonia oxidizing bacteria and ammonia oxidizing archaea in soils in different treatments

[注 (Note): 误差线为标准误差, 大写字母代表 AOB 的差异性, 小写字母代表 AOA 的差异性 Error bars indicate one standard error, capital letters represent differences of AOB, and lower case letters represent differences of AOA ($\alpha = 0.05$).]

壤中氨氧化细菌的数量显著高于不施肥和单施化肥处理, 为 $4.59 \times 10^6 \sim 5.77 \times 10^6$ copies/g 干土, 其中单施有机肥 (M_2) 处理氨氧化细菌数量最多。与 CK (平均值为 2.64×10^6 copies/g) 相比, 施用有机肥处理氨氧化细菌的数量提高了 73.9%~118.6%; 而单施氮肥 (N_1 、 N_2) 处理氨氧化细菌的数量最低, 分别为 1.21×10^6 copies/g、 0.94×10^6 copies/g 干土, 与 CK 相比分别降低了 54.2% 和 64.4%。

不同施肥处理氨氧化古菌丰度总体趋势为有机肥区 > CK > 化肥区。施用有机肥各处理土壤氨氧化古菌的丰度为 $8.31 \times 10^6 \sim 1.22 \times 10^7$ copies/g 干土, 与 CK 相比提高了 57.7%~131.9%, 其中单施有机肥 (M_2) 处理的土壤中氨氧化古菌丰度最高。而单施氮肥 (N_1 、 N_2) 能显著降低氨氧化古菌的丰度, 较 CK 分别降低了 29.8% 和 32.3%。

结果表明, 长期施用有机肥可以显著提高棕壤氨氧化微生物的丰度, 而长期氮、磷、钾肥配施 (N_1P 、 N_1PK) 比单施氮肥 (N_1 、 N_2) 氨氧化微生物丰度也有明显的增加。这可能是由于有机肥可以改善土壤理化性质、提供大量的养分, 从而为微生物的生长提供有利的生存环境^[22-23], 而长期的单一施肥会导致土壤中有些养分长期的缺失或积累, 改变土壤的 pH 值, 进而影响土壤中微生物的活性和数量, 这与贺纪正等^[24]研究结果相近。

2.4 不同施肥处理土壤氨氧化微生物随作物生育时期的变化

由图 3 可以看出, 施用有机肥处理, 整个生育时期都能检测到 *amoA* 基因, 且 AOB 的丰度基本呈现从播前到苗期、拔节期先增加, 抽雄期以后减少, 最后收获期达到平稳的状态。在苗期 (5 月 31 日) 和拔节期 (6 月 28 日) AOB 的丰度较高, 为 $1.68 \times 10^7 \sim$

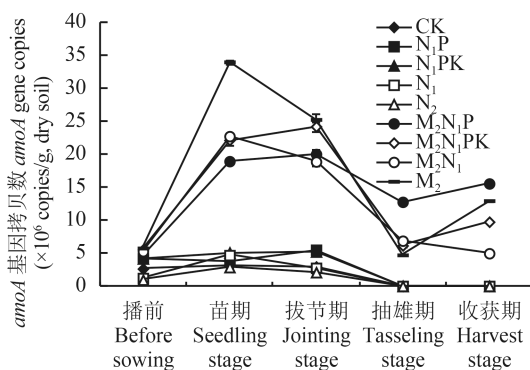


图 3 玉米各生育期土壤氨氧化细菌丰度的变化

Fig. 3 Abundance of ammonia oxidizing bacteria in soils of different treatments during various maize growth stages

3.17×10^7 copies/g 干土。CK 和单施化肥处理, 播前、苗期、拔节期均检测到土壤中含有 *amoA* 基因, 而抽雄期和收获期土壤中 *amoA* 基因含量低于定量 PCR 的检出限, 所以未给出具体数值。这可能是由于这两个生育期 AOB 没有适宜的生存环境所致, 而有机肥能改善土壤的理化性质, 从而使得有机肥区还存有一定数量的 AOB。因此, 抽雄期和收获期有机肥区可检测到含有 AOB, 不施肥和单施化肥处理则标记为未检测到。

长期轮作施肥条件下, 玉米各生育期土壤 AOA 丰度变化如图 4 所示。不同施肥处理之间 AOA 丰度: 化肥区 (N_1P 、 N_1PK 、 N_1 、 N_2) 土壤 AOA 的丰度在玉米生育期内呈缓慢上升的趋势; 有机肥区和单施肥处理土壤 AOA 丰度从播前到拔节期缓慢增长, 但抽雄期以后大幅升高, 其中单施有机肥 (M_2) 处理土壤中 AOA 的上升幅度最大, 收获期各施肥处理土壤中 AOA 丰度达到最大, 为 $1.14 \times 10^7 \sim 1.95 \times 10^8$ copies/g 干土。玉米生育期内, 施用有机肥处理土壤中 AOA 数量的变化趋势明显大于 CK 和单施化肥处理, 这可能是因为施用的有机肥能带入大量养分, 具有保水保肥的能力, 从而增强了土壤微生物的活性, 促进了土壤中 AOA 数量的快速增长。结果表明玉米整个生育期内, 施用有机肥更有利于提高土壤氨氧化古菌的丰度。

2.5 土壤理化性质对棕壤氨氧化微生物的影响

由表 3 可知, 长期施肥条件下 AOB 的丰度与 pH、土壤有机质 (SOM)、全氮 (TN)、碱解氮 (AHN)、速效磷 (AP)、速效钾 (AK) 的相关系数分别为 0.814、0.824、0.769、0.751、0.788、0.638, 与土壤含水量 (MC) 相关系数仅为 0.178。可以看出土壤 pH 和 SOM 与 AOB 丰度的相关性最大, 其次为

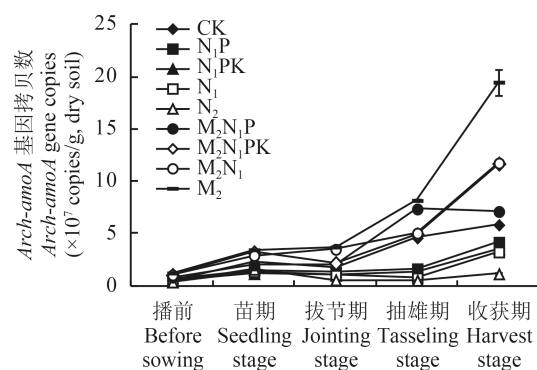


图 4 玉米各生育期土壤氨氧化古菌的丰度

Fig. 4 Abundance of ammonia oxidizing archaea in soils in different treatments during various maize growth stages

表 3 氨氧化微生物与土壤理化性质的相关系数

Table 3 Correlation coefficients among ammonia-oxidizing microorganisms and soil physicochemical properties

| 因子 Factor | pH | 碱解氮 Alk.-hydr. N | 含水量 Moisture | 有机质 SOM | 全氮 Total N | 速效磷 Avail. P | 速效钾 Avail. K |
|--------------|--------|---------------------|-----------------|------------|---------------|-----------------|-----------------|
| AOB | 0.814* | 0.751* | 0.178 | 0.824* | 0.769* | 0.788* | 0.638* |
| AOA | 0.942* | 0.898* | 0.222 | 0.933* | 0.900* | 0.572* | 0.836* |

注 (Note): *代表 AOB、AOA 与土壤理化性质显著相关 ($P < 0.05$) Represents AOB and AOA were significantly correlated with soil physical and chemical properties ($P < 0.05$).

TN、AHN、AP 和 AK, 且均呈显著正相关; 而 MC 与 AOB 的丰度相关性不大。AOA 丰度与 pH、AHN、SOM、TN、AP、AK 的相关系数分别为 0.942、0.898、0.933、0.900、0.572、0.836, 可知土壤 pH、SOM 和 TN 与 AOA 丰度的关系最为密切, 其次为碱解氮、速效磷、速效钾, 且均呈显著正相关, 而 MC 与 AOA 丰度则无显著相关。

由冗余分析结果图 5 可知, 不同施肥处理棕壤 AOA 和 AOB 丰度的主要影响因素有土壤 pH、土壤有机质 (SOM) 和全氮 (TN)、碱解氮 (AHN)、速效磷 (AP)、速效钾 (AK), 而土壤含水量则对 AOA 和 AOB 的丰度无明显影响力。

3 讨论和结论

关于长期施肥对土壤氨氧化微生物群落多样性和丰度影响的报道较多, 不同施肥方式土壤氨氧化微生物的丰度存在明显差异。本研究中, 单施氮肥处理 (N_1 、 N_2) AOB 和 AOA 的丰度最低。对湖南祁阳旱地肥力及肥料效应变化长期定位试验点红壤 (pH

3.7~5.8) 的研究结果显示, AOB 和 AOA 的数量在只施氮肥的处理 (N) 中最低^[24], 与本研究的結果一致。这可能是由于单施氮肥处理土壤 pH 值偏低, 土壤养分含量单一, 严重影响土壤微生物的生存环境而导致, 而究竟由何种原因所引起, 则需进一步设计试验来验证。施用有机肥处理 AOA 和 AOB 的数量显著高于不施肥和单施化肥处理; 这可能是由于施用有机肥能增加土壤微生物利用碳源的能力, 改善微生物营养条件^[23], 提高土壤生物的活性^[24-26], 改善土壤的理化性状^[27], 提高土壤微生物的数量, 因此施用有机肥处理的 AOA 和 AOB 丰度显著高于单施化肥及不施肥处理, 这与朱敏等^[14]研究结果相似, 即长期使用有机肥能增加土壤氨氧化微生物的数量。各处理中土壤 AOA 的数量明显多于 AOB, 这可能是由于氨氧化古菌对环境的适应性高于氨氧化细菌, 在土壤环境中相对稳定。

已有研究证明^[18, 28], 土壤理化性质与氨氧化微生物的丰度和群落结构有一定的相关性, 能影响土壤氨氧化微生物的数量。本研究结果表明, 影响棕壤

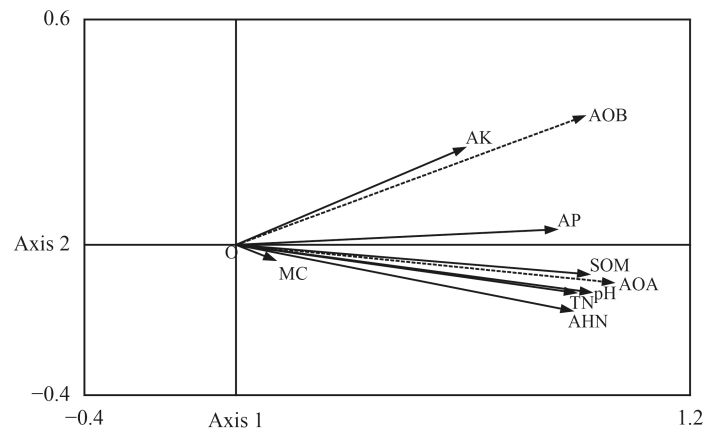


图 5 棕壤氨氧化微生物与土壤理化性质的冗余分析

Fig. 5 Redundancy analysis depicting the relationship among soil physicochemical properties and ammonia-oxidizing microorganisms in brown soil

[注 (Note): 虚线箭头代表 AOB、AOA 丰度, 实线箭头代表土壤理化性质, 实线和虚线夹角的余弦值决定它们之间的相关性 (通过蒙特卡罗检验, $P < 0.05$) The dashed arrows represent AOB and AOA abundances, the solid lines represent soil physical and chemical properties, and the cosine of included angles of the solid line and the dashed line determines the correlation among them (Monte Carlo test, $P < 0.05$).]

氨氧化微生物丰度的主要环境因子有土壤 pH、有机质、全氮、碱解氮、速效磷、速效钾。黄蓉等^[29]对万木林土壤研究得出氨氧化微生物丰度与土壤理化性质的相关性均不强,仅 AOB 丰度与土壤速效磷呈正相关,与本研究结果不一致。这可能是由于不同的土壤类型、耕作制度和土地利用方式等所导致的。

长期轮作施肥显著改变了棕壤的化学性质,从而对氨氧化微生物的丰度产生了显著影响。长期施用有机肥显著提高了土壤养分含量及 AOB 和 AOA 的丰度,对维持土壤氨氧化微生物的数量起到十分重要的作用;影响氨氧化微生物丰度的主要环境因子包括土壤 pH、有机质、全氮、碱解氮、速效磷以及速效钾,这为调控土壤氨氧化微生物数量及其在氮素转化中的作用提供了科学依据。而氨氧化微生物在玉米生育期内变化也很明显,具体受到哪些因素的影响则需要进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: A review[J]. *Biology & Fertility of Soils*, 1999, 29(2): 111–129.
- [2] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55(2): 485–529.
- [3] De Boer W, Klein Gunnewiek P J, Veenhuis M, *et al.* Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1991, 57(12): 3600–3604.
- [4] Fauci M F, Dick R P. Soil microbial dynamics: short and long-term effects of inorganic and organic nitrogen[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1994, 58(3): 801–806.
- [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[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9): 2364–2374.
- [6] 辛亮, 武传东, 曲东. 长期施肥对旱地土壤中氨氧化微生物丰度和分布的影响[J]. *西北农业学报*, 2012, 21(6): 41–46.
Xin L, Wu C D, Qu D. Long-term fertilization determining ammonia-oxidizing organism abundance and distribution in dry highland soil of loess plateau[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2012, 21(6): 41–46.
- [7] 姚槐应, 何振立, 黄昌勇. 不同土地利用方式对红壤微生物多样性的影响[J]. *水土保持学报*, 2003, 17(2): 51–54.
Yao H Y, He Z L, Huang C Y. Effect of land use history on microbial diversity in red soils[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2003, 17(2): 51–54.
- [8] 张慧, 袁红朝, 朱亦君, 等. 不同利用方式对红壤坡地微生物多样性和硝化势的影响[J]. *生态学杂志*, 2011, 30(6): 1169–1176.
Zhang H, Yuan H C, Zhu Y J, *et al.* Microbial diversity and nitrification potential of sloping land red soil under different land use patterns[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(6): 1169–1176.
- [9] 徐丽君, 杨桂霞, 王波, 等. 北方栽培草地土壤微生物特征对不同利用方式的响应[J]. *草业与畜牧*, 2015, (4): 24–30.
Xu L J, Yang G X, Wang B, *et al.* Microbial characteristics of different use patterns of cultivated pasture in northern of China[J]. *Prataculture and Animal Husbandry*, 2015, (4): 24–30.
- [10] 王影, 张志明, 李晓慧, 等. 土地利用方式对土壤细菌、泉古菌和氨氧化古菌丰度的影响[J]. *生态学杂志*, 2013, 32(11): 2931–2936.
Wang Y, Zhang Z P, Li X H, *et al.* Effects of land use type on the abundance of bacteria, crenarchaea and ammonia-oxidizing archaea in black soil[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(11): 2931–2936.
- [11] 李晓慧. 不同作物与施肥对黑土氨氧化微生物的影响[D]. 北京: 中国科学院研究生院博士学位论文, 2013.
Li X H. Impact of different crops and fertilization on ammonia oxidizing bacteria and archaea in black soil[D]. Beijing: PhD Dissertation of Chinese Academy of Sciences, 2013.
- [12] 张瑞, 张贵龙, 陈冬青, 等. 不同施肥对农田土壤微生物功能多样性的影响[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(2): 133–139.
Zhang R, Zhang G L, Chen D Q, *et al.* The effects of different fertilization on the functional diversity of soil microbial community[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(2): 133–139.
- [13] 周志成, 罗葵, 唐前君, 等. 不同施肥方式对红壤蔬菜田氨氧化细菌和氨氧化古菌群落的影响[J]. *中国蔬菜*, 2015, 1(7): 33–39.
Zhou Z C, Luo K, Tang Q J, *et al.* Effect of different fertilization on ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea in red soil vegetable field[J]. *China Vegetables*, 2015, 1(7): 33–39.
- [14] 朱敏, 郭志彬, 曹承富, 等. 不同施肥模式对砂姜黑土微生物群落丰度和土壤酶活性的影响[J]. *核农学报*, 2014, 28(9): 1693–1700.
Zhu M, Guo Z B, Cao C F, *et al.* Impact of model of fertilization on microbial abundance and enzyme activity in lime concretion black soil[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(9): 1693–1700.
- [15] 裴雪霞, 周卫, 梁国庆, 等. 长期施肥对黄棕壤性水稻土氨氧化细菌多样性的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2011, 17(3): 724–730.
Pei X X, Zhou W, Liang G Q, *et al.* Effects of long-term fertilization on ammonium oxidizing bacterial diversity in a paddy soil derived from yellow-brown earth[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2011, 17(3): 724–730.
- [16] 于涌杰. 土地利用方式对中国东南部红壤微生物特性及氮转化作用的影响[D]. 南京: 南京师范大学博士学位论文, 2012.
Yu Y J. Effect of land-use types on microbial properties and nitrogen transformation in red soil of southeastern China[D]. Nanjing: PhD Dissertation of Nanjing Normal University, 2012.
- [17] Zhong M, Zhou Q. Molecular-ecological technology of microorganisms and its application to research on environmental pollution[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(2): 247–251.
- [18] 张晶, 张惠文, 张成刚. 实时荧光定量PCR及其在微生物生态学中的应用[J]. *生态学报*, 2005, 25(6): 1445–1450.
Zhang J, Zhang H W, Zhang C G. Real-time fluorescent quantitative PCR and its application in microbial ecology[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(6): 1445–1450.

- [19] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
Bao S D. Analytical methods of soil agricultural chemistry[M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2000.
- [20] 李景云, 秦嗣军, 葛鹏, 等. 不同生育期苹果园土壤氨氧化微生物丰度研究[J]. 植物营养与肥科学报, 2016, 22(4): 1149–1156.
Li J Y, Qin C J, Ge P, *et al.* Abundance of ammonia oxidizers in apple orchard soil at different growth stages[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2016, 22(4): 1149–1156.
- [21] 袁颖红. 长期施肥对红壤性水稻土氮素形态的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(16): 8550–8553.
Yuan Y H. Effects of long-term different fertilizations on nitrogen in red paddy soil[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(16): 8550–8553.
- [22] 胡可, 李华兴, 卢维盛, 等. 生物有机肥对土壤微生物活性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2010, 18(2): 303–306.
Hu K, Li H X, Lu W C, *et al.* Effect of microbial organic fertilizer application on soil microbial activity[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2010, 18(2): 303–306.
- [23] Lovell R D, Jarvis S C, Bardgett R D. Soil microbial biomass and activity in long-term grassland: Effects of management changes[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1995, 27(7): 969–975.
- [24] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展[J]. 生态学报, 2009, 29(1): 406–415.
He J Z, Zhang L M. Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle[J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(1): 406–415.
- [25] Kautz T, Wirth S, Ellmer F. Microbial activity in a sandy soil is governed by the fertilization regime[J]. European Journal of Soil Biology, 2004, 40(2): 87–94.
- [26] Plaza C, Hernández D, García-Gil J C, *et al.* Microbial activity in pig slurry-amended soils under semiarid conditions[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2004, 36(10): 1577–1585.
- [27] 何晓雁, 郝明德, 李慧成, 等. 黄土高原旱地小麦施肥对产量及水肥利用效率的影响[J]. 植物营养与肥科学报, 2010, 16(6): 1333–1340.
He X Y, Hao M D, Li H C, *et al.* Effects of different fertilization on yield of wheat and water and fertilizer use efficiency in the Loess Plateau[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2010, 16(6): 1333–1340.
- [28] Allison S D. Cheaters, diffusion and nutrients constrain decomposition by microbial enzymes in spatially structured environments[J]. Ecology Letters, 2005, 8(6): 626–635.
- [29] 黄蓉, 张金波, 钟文辉, 等. 土地利用方式对万木林土壤氨氧化微生物丰度的影响[J]. 土壤, 2012, 44(4): 581–587.
Huang R, Zhang J B, Zhong W H, *et al.* Abundances of ammonia-oxidizing prokaryotes and gross nitrification activities in forest soils under different vegetation in a natural reserve[J]. Soils, 2012, 44(4): 581–587.