

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2022.06.009

宋延静, 张晓黎, 付焯, 等. 滨海盐渍化土壤中氨氧化微生物丰度和多样性特征. 土壤, 2022, 54(6): 1157–1164.

滨海盐渍化土壤中氨氧化微生物丰度和多样性特征^①

宋延静^{1,2,3}, 张晓黎², 付焯^{1,3}, 李萌^{1,3}, 王洁¹, 马兰^{1,3*}

(1 山东省蚕业研究所, 山东烟台 264002; 2 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室(烟台海岸带研究所), 山东烟台 264003; 3 山东省农业科学院黄河三角洲现代农业研究院, 山东东营 257091)

摘要: 为探究滨海盐土不同盐度梯度下氨氧化微生物的丰度和多样性特征, 利用土壤化学和分子生态学手段(定量 PCR、T-RFLP)对莱州湾南岸及黄河口 4 个河口断面(黄河、白浪河、堤河、胶莱河)14 个不同盐度(6.4‰~51.1‰)盐渍化土壤样品的氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)的硝化潜势、丰度及多样性进行了分析。结果发现: 土壤硝化潜势在高盐度(34.7‰~51.1‰)条件下被显著抑制, 主要受土壤盐度、pH 和 NO₃-N 水平显著影响; AOA-*amoA* 基因丰度比 AOB-*amoA* 高出两个数量级, 在中盐度时丰度最高(9.92×10⁶ copies/g 土), 在高盐度时受到显著抑制(5.28×10⁶ copies/g 土, *P*<0.05); AOB-*amoA* 基因丰度受盐度的影响, 低盐度时显著高于中、高盐度条件; 然而 AOA 和 AOB 的多样性和群落结构受盐度梯度影响不大。相关分析表明, 硝化潜势与 AOA 和 AOB 丰度均无显著相关性, 而与 AOA/AOB 比值以及 AOA 的 Shannon 指数显著负相关。由此可见, 滨海盐土中, 盐度的波动对土壤氨氧化活性和功能微生物都会产生剧烈的影响, 盐度和 pH 造成的土壤氮素有效性的变化可能是影响滨海盐土硝化活性和氨氧化微生物丰度及群落组成的关键因素。

关键词: 滨海盐土; 硝化潜势; 氨氧化细菌和古菌; 盐度梯度; 群落结构

中图分类号: X172 **文献标志码:** A

Patterns of Activity and Community of Ammonia Oxidizers Along Salinity Gradient in Salinized Soils

SONG Yanjing^{1,2,3}, ZHANG Xiaoli², FU Rao^{1,3}, LI Meng^{1,3}, WANG Jie¹, MA Lan^{1,3*}

(1 *Sericultural Research Institute of Shandong Province, Yantai, Shandong* 264002, China; 2 *Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong* 264003, China; 3 *Institute of Modern Agriculture on Yellow River Delta, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Dongying, Shandong* 257091, China)

Abstract: To explore the effects of the salinity gradient on the abundance and diversity of ammonia-oxidizing microorganisms in coastal salinized soils, salinized soil samples with different salinities (6.4‰–51.3‰) were collected from four estuary transects (Yellow River, Bailang River, Di River, and Jiaolai River) in the southwest coast of Laizhou Bay. The methods of soil chemistry and molecular ecology (qPCR and T-RFLP) were applied to analyze the activities, abundance and community structures of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB). The results showed that soil nitrification potential (NP) was significantly inhibited at high salinity (34.7‰–51.3‰) and it was significantly correlated with soil salinity, pH, and NO₃-N level. Abundance of AOA-*amoA* gene was two orders of magnitude higher than that of AOB-*amoA* gene, which was highest at medium salinity (9.92×10⁶ copies/g soil), and was inhibited at high salinity (5.28×10⁶ copies/g soil, *P*<0.05). Abundance of AOB-*amoA* was correlated with soil salinity, which was highest at low salinity and significantly reduced at medium and high salinities. However, the diversities and community structures of both AOA and AOB were little affected by the salinity gradient based on the T-RFLP data. Furthermore, correlation analysis showed that NP was not significantly correlated with abundance of AOA or AOB, but negatively significantly correlated with the ratio of AOA/AOB and the Shannon index of AOA. In conclusion, the ammonia

①基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD1002703)、山东省自然科学基金项目(ZR2021QD145)和山东省农业科学院农业科技创新工程项目(CXGC2022A37)资助。

* 通讯作者(cysmalan@shandong.cn)

作者简介: 宋延静(1985—), 山东烟台人, 博士, 助理研究员, 主要从事土壤微生物生态、氮循环及盐碱滩涂生物修复技术研究。E-mail: yjsong1214@163.com

oxidation activity and its functional microorganisms in coastal saline soils were affected intensively by the fluctuation of salinity. The changes of soil nitrogen availability caused by salinity and pH may be the key factors affecting nitrification activity, microbial abundance and community composition in coastal saline soils.

Key words: Coastal salinized soil; Nitrification potential; Ammonia-oxidizing bacteria and archaea; Salinity gradient; Community structure

土壤盐渍化是造成滨海土壤质量下降的重要原因之一。滨海盐土高盐度、高 pH 的特征对土壤肥力和微生物的多样性及生态功能均有不利影响^[1]。滨海盐土氮的有效性低、保水保肥性差,严重制约区域的土壤地力。解析滨海盐土氮循环微生物的活性、多样性及分布规律,能够为理解滨海土壤生态系统功能退化提供基础数据,对改善土壤性质,提高肥力,探索并最终形成盐渍化生态系统修复的技术体系具有重要意义。

大量研究表明,盐分会抑制氮的矿化作用。但也有部分研究显示,轻度盐渍化会促进氮的矿化,而重度盐渍化会抑制氮的矿化,尤其是当土壤中含盐量达到 0.5% ~ 1.0% 时,土壤的硝化作用会被完全抑制^[2-4]。硝化过程受微生物驱动,其中氨氧化过程是其限速步骤,由化能自养的氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)共同完成。这两种菌都含有编码催化氨氧化第一步反应的氨单加氧酶基因(*amo*)。利用氨单加氧酶 α 亚基基因(*amoA*)作为分子标记可研究 AOB 和 AOA 在环境中的多样性、群落组成及丰度特征^[5]。盐度也是影响土壤氨氧化微生物功能和多样性的重要因子,高盐和低盐环境中, AOA 和 AOB 的群落组成也差别迥异^[6]。Sahan 等^[7]证实韦斯特谢尔德河口的 AOB 多样性在低盐区高于高盐区。Mosier 和 Francis^[8]在对旧金山湾沉积物 AOA 的分析中发现,来自低盐河口区的 AOA 形成了独特的低盐群。滨海盐土除了具有明显的盐度梯度外,还有营养贫瘠、pH 偏高等特征。然而目前针对这种土壤的 AOA 和 AOB 活性、组成、丰度及其环境调控机制尚不清楚。

莱州湾沿岸海水入侵面积超过 4 300 km²,盐渍化面积达 2 100 km²,西南岸盐渍化程度最高,土壤自沿海到陆地呈现明显的梯度盐渍化特征。前期研究发现,该环境盐度对蓝细菌的组成和分布具有强烈影响^[9],但盐度梯度对氮循环微生物的影响并不清楚。由此,本研究拟利用地球化学、生物化学与微生物分子生态学交叉手段,研究莱州湾滨海盐渍土不同盐度梯度下 AOA 和 AOB 的多样性、群落组成、活性特征及其对环境因子的响应,以为深入研究盐渍

化土壤氮素循环特征及其功能类群的适应机制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 样品采集及处理

本研究在莱州湾西南岸(119°09' ~ 119°36' E, 36°56' ~ 37°46' N)的黄河口(YR)、白浪河口(BR)、堤河口(DR)及胶莱河口(JR)布设 4 个样带断面、14 个站位(图 1)进行样品采集。其中,黄河口断面 5 个站位(YR01 ~ YR05),白浪河口断面 2 个站位(DR01 和 DR02),堤河口断面 3 个站位(DR01 ~ DR03),胶莱河口断面 4 个站位(JR01 ~ JR04)。

样品采集时间为 2014 年 7 月,五点取样法取表层 0 ~ 5 cm 土样混匀。样品冰上保存转移到实验室,一部分 4℃ 保鲜并于 48 h 内进行氨氧化活性测定,另一部分 -80℃ 冷冻,用于测定土壤环境因子和提取土壤 DNA。

1.2 土壤理化因子的测定

土壤 pH 测定采用电位法;土壤含水量测定采用烘干法;土壤盐度通过测定水土质量比为 1 : 5 土壤溶液的电导率来获得。土壤经冷冻干燥后,2.5 g 干土中加入 25 ml 2 mol/L KCl 溶液浸提,振荡 1 h,过滤,利用连续流动分析仪测定土壤铵态氮(NH₄⁺-N)、硝态氮(NO₃⁻-N)和亚硝态氮(NO₂⁻-N)含量。土壤全氮(TN)、总有机碳(TOC)含量利用元素分析仪测定;土壤粒径(GS)采用激光粒度仪分析。

1.3 土壤硝化潜势(nitrification potential, NP)的测定

采用氯酸盐抑制法^[10],以每小时每克干土产生的 NO₂⁻-N 的量来表征。

1.4 土壤总 DNA 的提取与测定

称取 0.5 ~ 1.0 g 新鲜土样,准确记录数值,通过土壤含水量换算为干土质量,以便后续基因拷贝数的计算。利用 FastDNA@SPIN@(MP Biomedical, 美国)土壤 DNA 提取试剂盒按说明书要求提取 DNA。提取的 DNA 用微量紫外分光光度计(NanoDrop 2000c, 美国)测定浓度及纯度,分装后于 -80℃ 保存。

1) AOB 和 AOA 丰度分析。采用荧光定量 PCR

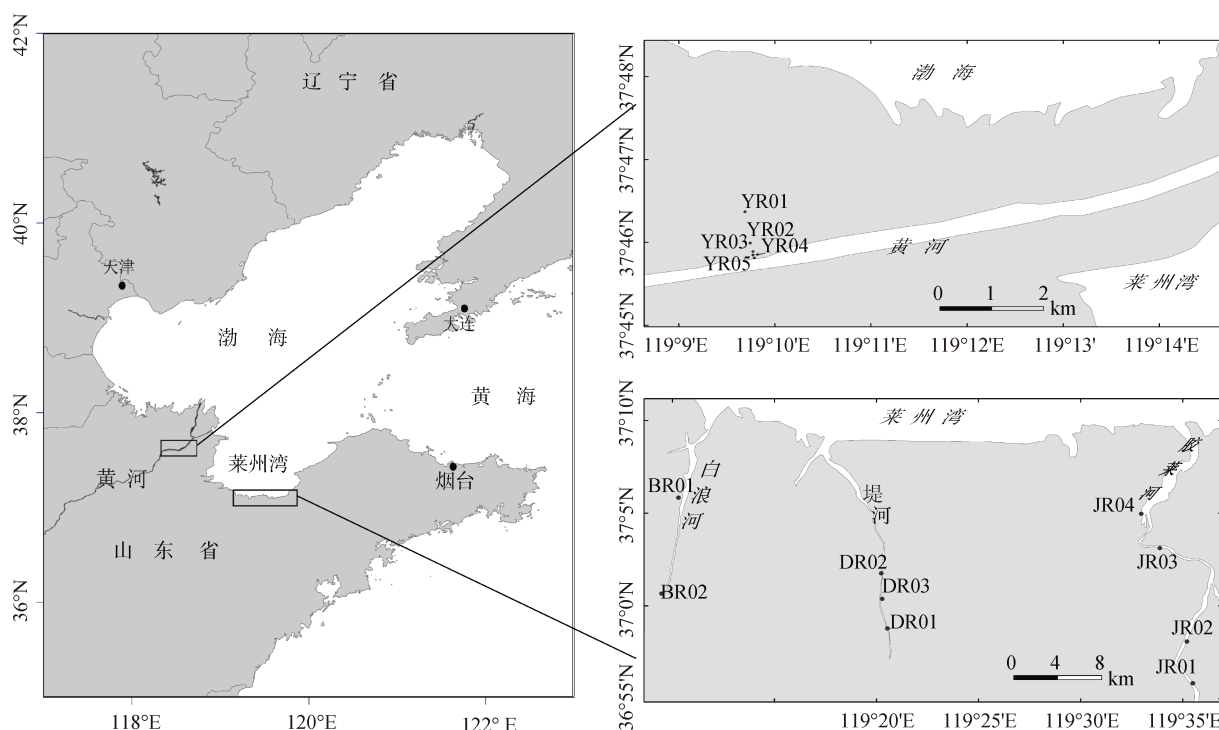


图1 莱州湾西南岸河口采样站位图

Fig. 1 Sampling sites along estuaries of southwestern coast of Laizhou Bay

技术测定 AOB-*amoA*(*amoA1F/amoA2R*)和 AOA-*amoA*(Arch-*amoA-for/Arch-amoA-rev*)基因的拷贝数。计算质粒拷贝数时,分别稀释 AOA 和 AOB 质粒至 $10^{-1} \sim 10^{-8}$,以拷贝数的对数为横坐标,CT 值为纵坐标建立标准曲线。每个样品 3 次重复,并设不加模板的反应管为阴性对照。所有 PCR 反应的扩增效率均在 90% 以上,相关系数(R^2)均大于 98%。

2)AOB 和 AOA 群落结构分析。以土壤总 DNA 为模板,采用末端限制性片段长度多态性方法(T-RFLP)分析盐度梯度土壤中 AOB(*amoA1F/amoA2R*)和 AOA(Arch-*amoA1F/Arch-amoA2R*)的群落结构。其中每对引物的前引物 5'端标记有荧光基团 6-羧基荧光素(FAM)。AOA-*amoA* 内切酶为 *RsaI* 和 *HhaI*,AOB-*amoA* 内切酶为 *RsaI* 和 *MspI*,酶切产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行毛细管电泳检测。

1.5 数据处理与统计分析

利用 SPSS 统计软件中的单因素方差分析(ANOVA)检验盐度梯度对硝化潜势、AOB 和 AOA 的丰度及多样性的影响,并利用最小显著差异法(LSD)比较不同盐度间的差异;利用 Spearman 相关性分析检验硝化潜势、AOB 和 AOA 的丰度及多样性与环境因子间的关系。通过群落生态分析软件 PRIMER-6 对 AOA 和 AOB 的群落结构进行非度量多维尺度(NMDS)排序,并利用 ANOSIM 检验盐度梯度

对 AOB 和 AOA 群落结构的影响。利用 CANOCO 软件中的典范对应分析(CCA 或 RDA)探索氨氧化微生物群落结构与环境变量之间的关系。

2 结果与分析

2.1 土壤理化因子

本研究获得的所有样品可划分为低盐度(盐度平均值 6.8‰,变幅 6.4‰~7.6‰)、中盐度(盐度平均值 16.44‰,变幅 12.5‰~23.9‰)、高盐度(盐度平均值 44.47‰,变幅 34.7‰~51.3‰)3 个梯度^[11],其中低盐度包括站点 YR05、JR01、DR01,中盐度包括站点 YR01、YR04、BR01、BR02、DR03、JR02、JR03、JR04,高盐度包括 YR02、DR02、YR03。pH 范围为 7.35~7.58,属于弱碱性土壤。无机氮营养盐中以 NO_3^- -N 为主,其中,低、中、高盐度土壤 NO_3^- -N 含量平均值分别为 6.05、26.37 和 23.25 mg/kg。 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 含量不同盐度梯度间差别不大。全氮含量范围为 0.59~0.88 g/kg,总有机碳含量 5.77~7.19 g/kg(表 1)。

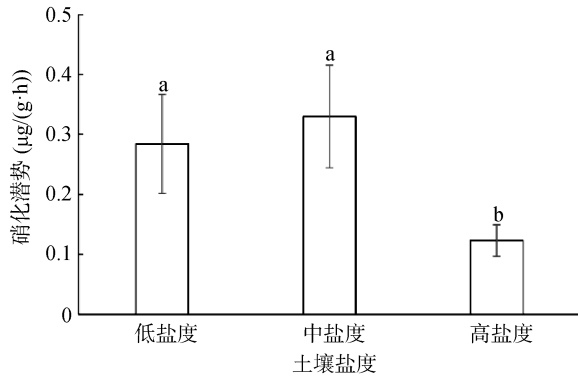
2.2 土壤硝化潜势

从图 2 中可以看出,高盐度土壤硝化潜势平均为 0.12 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$,与低盐度(0.28 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$)和中盐度(0.33 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$)相比显著降低($P<0.01$),说明高盐度显著抑制了土壤的硝化潜势。

表 1 土壤样品理化因子($n=3$)
Table 1 Physicochemical parameters of saline soils of southwestern coast of Laizhou Bay

盐度 梯度	pH	盐度 (%)	含水量 (%)	NO ₃ -N (mg/kg)	NO ₂ -N (mg/kg)	NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	全氮 (g/kg)	总有机碳 (g/kg)	粒径 (d0.5, μm)
低盐度	7.40 ± 0.15	6.8 ± 0.57	27.00 ± 3.04	6.05 ± 0.37	0.74 ± 0.25	0.09 ± 0.03	0.68 ± 0.20	7.19 ± 2.63	37.61 ± 19.97
中盐度	7.35 ± 0.20	16.44 ± 3.85	21.59 ± 2.26	26.37 ± 42.93	0.65 ± 0.36	0.11 ± 0.07	0.88 ± 1.12	6.47 ± 3.57	56.83 ± 23.01
高盐度	7.58 ± 0.31	44.47 ± 8.68	10.20 ± 10.32	23.25 ± 30.1	0.59 ± 0.16	0.093 ± 0.006	0.59 ± 0.09	5.77 ± 1.48	33.69 ± 35.26

注: d0.5 表示平均粒径, 指粒度累计分布中 50% 所对应的直径。



(柱图上方不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$), 下同)

图 2 不同盐度梯度土壤的硝化潜势

Fig. 2 Nitrification potentials in soils under different salinity gradients

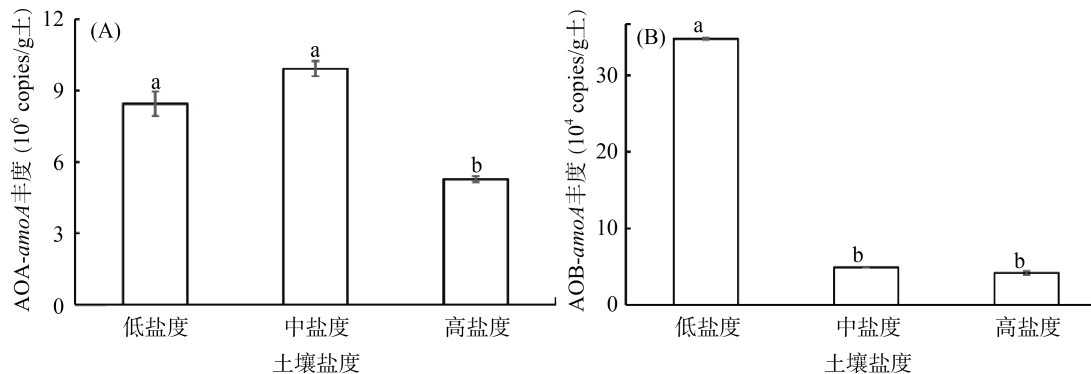


图 3 不同盐度梯度间 AOA(A)和 AOB(B)amoA 基因丰度的比较

Fig. 3 Abundances of AOA (A) and AOB (B) *amoA* in soils under different salinity gradients

AOB-*amoA* 基因丰度在盐度梯度间存在极显著性差异($P<0.01$, 图 3B), 其中低盐度土壤 AOB-*amoA* 基因丰度为 3.48×10^5 copies/g 土, 显著高于中盐度土壤 (4.90×10^4 copies/g 土) 和高盐度土壤 (4.16×10^4 copies/g 土)。

2.4 基于 T-RFLP 分析的土壤 AOA 和 AOB 多样性和群落结构

除样品 JR05 的 AOA-*amoA* 基因没有获得理想的结果外, 其他样品经 T-RFLP 分析发现, AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 的 T-RF 数目在低、中、高盐度土壤中均无显著性差异(表 2)。AOA 的均匀度指数和 Shannon 指数在低、高盐度土壤中差异不显著($P>0.05$),

2.3 基于 *amoA* 基因荧光定量 PCR 的 AOB 和 AOA 丰度

莱州湾滨海盐土中 AOB 的丰度为 $10^4 \sim 10^5$ copies/g 土, AOA 的丰度为 10^6 copies/g 土(图 3)。所有样品中 AOA-*amoA* 基因丰度高出 AOB-*amoA* 约 2 个数量级, 说明莱州湾滨海盐土中的氨氧化微生物群落以 AOA 为主。

AOA-*amoA* 基因丰度在中盐度土壤中的平均值最高, 为 9.92×10^6 copies/g 土, 其次是低盐度土壤 (8.45×10^6 copies/g 土), 高盐度土壤中最低 (5.28×10^6 copies/g 土), 其中高盐度土壤中 AOA-*amoA* 的丰度显著低于低、中盐度土壤($P<0.05$, 图 3A)。

但均显著高于中盐度土壤($P<0.05$)(表 2)。

NMDS 分析结果显示, 所有样品的 AOA 类群可分为 2 个群组: A 组(BR01、BR02、DR03、YR04、JR01、YR02 和 YR03)和 B 组(JR04、JR02、JR03、YR01 和 DR02)。低盐度样品 DR01 的 AOA 群落结构与其他样品差异较大(图 4A)。ANOSIM 检验(表 3)发现, AOA 的群落结构不受盐度梯度影响($P=0.23$)。AOB 的 NMDS 分析结果(图 4B)显示, 所有样品被分为 3 个群组: A 组包括 DR01、DR02、DR03、JR01 和 BR01; B 组包括 YR01、YR02、YR03、YR05、JR03、和 BR02; C 组包括 YR04 和 JR04。

表 2 基于 T-RFLP 分析的滨海盐土 AOA 和 AOB 的多样性指数
Table 2 Diversity indexes of AOA and AOB in saline soils based on T-RFLP analysis

盐度梯度	AOA-amoA			AOB-amoA		
	T-RF 数目	均匀度指数	Shannon 指数	T-RF 数目	均匀度指数	Shannon 指数
低盐度	14.50 ± 4.50 a	0.81 ± 0.06 a	2.32 ± 0.08 a	12.50 ± 5.31 a	0.71 ± 0.09 a	1.73 ± 0.54 a
中盐度	14.10 ± 1.19 a	0.59 ± 0.77 b	1.62 ± 0.39 b	13.00 ± 1.94 a	0.77 ± 0.06 a	1.96 ± 0.25 a
高盐度	19.00 ± 1.53 a	0.75 ± 0.06 a	2.21 ± 0.17 a	15.67 ± 2.03 a	0.80 ± 0.06 a	2.20 ± 0.26 a
P 值	0.14	0.27	0.10	0.47	0.63	0.52

注：盐度梯度间的总体差异水平用 P 值指征；同列不同小写字母表示组间差异显著(P<0.05)。

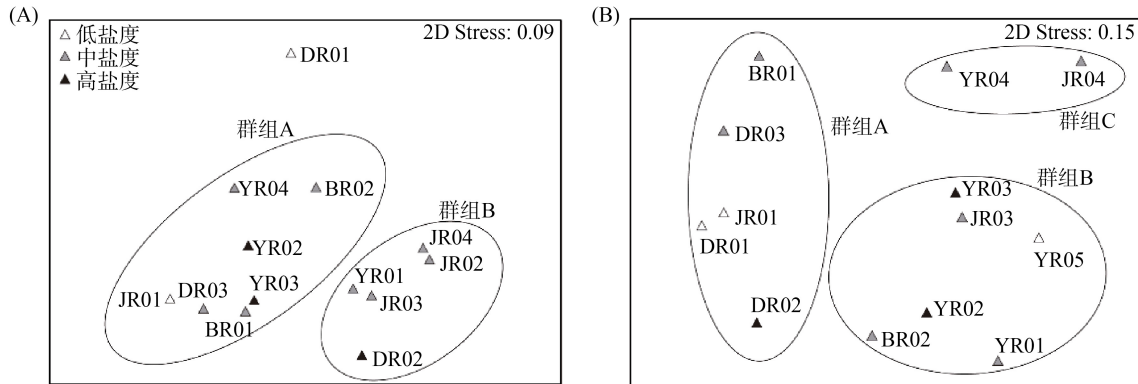


图 4 AOA(A)和 AOB(B)amoA 基因群落结构的非度量多维标度(NMDS)分析
Fig. 4 NMDS analysis of community composition of AOA and AOB amoA genes in saline soils

表 3 盐度梯度间 AOA 和 AOB amoA 基因群落结构的 ANOSIM 分析

Table 3 ANOSIM analysis for groupings of AOA and AOB amoA gene communities between salinity gradients

分组	R 值	P 值	分组	R 值	P 值
AOA	0.12	0.23	AOB	-0.16	0.89
高盐度 vs 低盐度	-0.12	0.75	高盐度 vs 低盐度	-0.21	0.88
高盐度 vs 中盐度	0.43	0.07	高盐度 vs 中盐度	-0.08	0.66
中盐度 vs 低盐度	0.08	0.40	中盐度 vs 低盐度	-0.04	0.60

注：R 值用来检验组间(两组或多组)差异是否显著大于组内差异，P<0.05 时表示组间差异大于组内差异。

2.5 土壤 AOA 和 AOB 丰度、多样性和群落结构及环境因子间的关系

从表 4 可以看出,莱州湾滨海盐土的硝化潜势与盐度($\rho = -0.58$)和 pH($\rho = -0.55$)显著负相关($P < 0.05$),而与 $\text{NO}_3\text{-N}$ 水平显著正相关($\rho = 0.37, P < 0.05$)。AOA 的丰度与土壤 pH 显著正相关($\rho = 0.39, P < 0.05$),而与土壤全氮($\rho = -0.36$)、总有机碳($\rho = -0.37$)、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\rho = -0.45$)和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 含量($\rho = -0.33$)显著负相关($P < 0.05$)。AOB 的丰度与所有环境因子的相关性均不显著($P > 0.05$)。另外, AOA/AOB 比值与土壤 pH 显著正相关($\rho = 0.36, P < 0.05$),而与全氮含量($\rho = -0.39, P < 0.05$)显著负相关。AOA 和 AOB 的 Shannon 指数与所有环境因子均无显著相关性($P > 0.05$)。典范对应分析发现, AOA 和 AOB 的群落结构与所有环境因子均无显

著性相关($P > 0.05$)。

将硝化潜势与微生物指标(*amoA* 丰度、AOA/AOB 比值、Shannon 指数)进行 Spearman 相关分析发现,硝化潜势与 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因丰度并无显著相关($P > 0.05$),但与 AOA/AOB 比值存在显著负相关关系($\rho = -0.35, P = 0.04$);另外,硝化潜势与 AOA 的 Shannon 指数也呈显著负相关关系($\rho = -0.68, P = 0.008$)。

表 4 AOA 和 AOB 丰度、多样性指数与环境因子间的 Spearman 相关性(ρ 值)

Table 4 Spearman's correlation coefficients (ρ) of nitrification potential, abundance and Shannon index of AOA and AOB with physicochemical factors

	硝化潜势	amoA 基因丰度			Shannon 指数	
		AOA	AOB	AOA/AOB	AOA	AOB
pH	-0.55*	0.39*	0.03	0.36*	0.29	0.14
盐度	-0.58*	-0.30	-0.29	0.32	0.29	0.39
含水量	0.10	0.45	0.35	0.01	0.49	0.49
粒径	0.08	0.14	-0.2	0.31	0.39	0.47
全氮	0.15	-0.36*	0.04	-0.39*	0.41	0.36
总有机碳	0.00	-0.37*	0.03	-0.28	0.51	0.29
铵态氮	0.08	-0.45*	-0.05	-0.32	0.14	0.35
亚硝态氮	0.00	-0.33*	-0.17	-0.28	0.74	0.64
硝态氮	0.37*	-0.28	0.04	-0.05	0.44	0.29
硝化潜势	-	-0.035	0.281	-0.35*	-0.68**	-0.215

注： ρ 为 Spearman 相关系数；AOA/AOB 为 AOA-amoA 与 AOB-amoA 丰度的比值；*、**分别表示相关性达 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 显著水平。

3 讨论

3.1 莱州湾西南岸滨海盐土特性

莱州湾河口区土壤具有明显的盐度梯度特征,盐度范围为 6.4‰ ~ 51.3‰,跨度较大,总体沿入海方向呈升高趋势。土壤属弱碱性,肥力较低,无机氮($\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 总和)含量在 4.33 ~ 132.98 mg/kg,远远低于耕地的氮水平,有机碳含量也低于一般土壤水平^[12]。

3.2 滨海盐土硝化潜力的特征及影响因素

莱州湾滨海盐土的潜在硝化速率在 0.11 ~ 0.51 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$,处于大多数河口区硝化速率的低值区^[13-14],可能的原因是这些河口区的研究对象为沉积物,其中氮含量相对较高,而本研究区域土壤 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量非常低,平均仅为 0.14 mg/kg,因此限制了硝化活性。将所有样品按盐度高(34.7‰ ~ 51.3‰)、中(12.5‰ ~ 23.9‰)、低(6.4‰ ~ 7.6‰)分组发现,土壤硝化潜势并不是简单地随盐度升高而降低,而是中盐度最高,但与低盐度差异不显著,高盐度最低(图 2)。该结果与以往报道一致,比如 Colne 河口^[14]、Randers Fjord 河口^[15]和 Douro 河口^[16]。盐度对硝化潜势的影响机制还不明确。有研究认为,盐度升高会降低土壤对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的吸附能力^[17],使氨氧化反应的底物减少,因此限制了氨氧化活性。在低盐度情况下,土壤 $\text{NH}_4\text{-N}$ 可利用性较高,高浓度 $\text{NH}_4\text{-N}$ 可能会抑制很多氨氧化微生物类群的活性^[13],特别对 AOA 具有抑制作用^[18];中盐度土壤的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 水平可能更适合氨氧化活性;而高盐度土壤中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 可利用性低,又限制了氨氧化活性^[12]。同时有研究认为,盐度变化会影响氨氧化微生物的生理,改变氨氧化微生物的群落结构,进而影响土壤氨氧化活性^[19]。

Spearman 相关性分析显示(表 5),除盐度外,硝化潜势还与 pH 显著负相关。莱州湾西南岸土壤 pH 范围为 7.11 ~ 7.94,属于弱碱性土壤。大量研究表明,土壤 pH 是影响硝化活性的关键因素,pH 7.5 ~ 8.5 是土壤硝化活性的最佳 pH 范围,而酸性和碱性条件都会抑制土壤的硝化活性^[20-21]。一方面可能是碱性和酸性条件下产生的自由 NH_3 和亚硝酸对氨氧化微生物细胞的毒性作用限制了硝化活性^[22];另一方面可能是酸性条件下, NH_3 被离子化变成 NH_4^+ ,增加了氨氧化的能量需求^[23]。按照这些假设,本研究中的 pH 范围应该比较适合土壤的硝化活性,然而结果却是硝化活性随土壤 pH 的升高而降低,推测其可能原因是,该区域土壤碱度升高是海水入侵导致的土壤盐渍化

所致,因此,这种负相关可能是盐度和 pH 共同作用的结果。

3.3 滨海盐土氨氧化微生物的丰度特征和环境响应

莱州湾滨海盐土所有样品中氨氧化微生物以 AOA 为主,这与国内外大多数河口环境的研究结果相一致^[13,24]。当然,也有例外,在 Douro 河口^[16]和 Cochin 河口^[25],AOB 的丰度显著高于 AOA,较高的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 水平被认为可能是造成这种特殊现象的主要原因。AOA-*amoA* 基因丰度在中盐度土壤中较高,高盐度土壤中最低(图 3A),而 AOB 丰度对盐度的响应趋势与 AOA 不同,在中、高盐度土壤中均被显著抑制(图 3B)。AOA 和 AOB 对盐度梯度的响应与很多河口类似^[26],即相对于 AOB,AOA 对盐度的耐受能力更高。这可能是由于 AOA 和 AOB 对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 亲和力的不同所导致的^[27],即 AOB 偏爱高 $\text{NH}_4\text{-N}$ 环境,低盐促进土壤对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的吸附,因而有利于 AOB 的生长;而 AOA 对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的亲合力较高,偏爱低 $\text{NH}_4\text{-N}$ 环境,中盐度土壤的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 水平可能比较适合 AOA 生长。当然,也有可能是 AOA 和 AOB 细胞对盐度的生理反应不同从而导致了这种生境选择^[19]。AOA 丰度与土壤 pH 显著正相关,与已有的认知“AOA 在酸性环境中占主导,而 AOB 在中性和碱性土壤中占优势”相悖^[20,23]。在莱州湾西南岸盐土中,土壤 pH 在氨氧化微生物的适宜范围内,此时 pH 的影响比较弱,而有限的氮底物则可能是氨氧化微生物生长的限制因素,pH 越高,越利于 $\text{NH}_4\text{-N}$ 向 NH_3 的转化,因而促进了 AOA 的生长。此外,AOA 丰度与土壤肥力显著负相关(表 5)。一般情况下,AOA 在肥力低的环境中贡献较大,主要是因为 AOA 对底物氨的亲合力远高于 AOB^[27],因此在低肥力土壤中更具竞争优势。白浪河口有效氮含量最低,因此,该区域 AOA 丰度明显高于其他河口,而 AOB 丰度则相反。

3.4 滨海盐土氨氧化微生物群落的分布特征

盐度被认为是控制河口区 AOB 和 AOA 群落结构和多样性最主要的因素。Bernhard 等^[13]发现在低、中盐度样品中,AOB 主要隶属于亚硝化螺菌属相关类群以及亚硝化单胞菌属,而在高盐度环境中,AOB 群落结构演替为以亚硝化螺菌属为主。另外,在韦斯特谢尔德河口,低盐度站点 AOB 的多样性较高盐度站点高^[28]。在对旧金山湾沉积物 AOA 的分析中发现,来自低盐度河口区的 AOA 形成了独特的低盐度类群^[6]。然而本研究中,盐度对 AOB 和 AOA 的多样性和群落结构均无显著影响。

3.5 硝化潜势与氨氧化微生物的关系

硝化潜势与 AOA 或 AOB 的丰度均无显著相关性, 而与 AOA/AOB 比值显著负相关(表 5)。这说明在莱州湾西南岸滨海盐土中, 虽然 AOA 是优势氨氧化菌, 但其丰度变化并不能很好地解释氨氧化活性的变化。该结果与之前本课题组在该区域碱土中(盐度 0.52‰, pH 8.0)添加生物质炭后, 硝化潜势与 AOA 丰度显著相关的结果不一致^[29], 暗示了环境因素(比如盐度及其造成的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 有效性差异, 以及生物质炭添加干预)是调控该区域滨海盐土硝化潜势的主要因素。而且, 即使该环境中 AOA 在丰度上占优势, 这些 AOA 也不一定表现氨氧化活性。另外, AOA/AOB 比值一般受土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 水平调控, 随 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 水平的升高而降低。在本研究贫瘠的土壤中, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 恰恰是硝化活性的限制因素, 因此硝化潜势与 AOA/AOB 比值间的负相关关系, 有可能是其对氮素需求的间接表现。

4 结论

莱州湾西南岸滨海盐土是非常脆弱的生态系统, 盐度高、pH 高、营养匮乏。在这种环境中, 盐度的波动对土壤氨氧化活性和功能微生物都会产生剧烈的影响。总体来说, 中盐度(12.5‰ ~ 23.9‰)比较适宜土壤硝化活性, 而高盐度会显著抑制硝化活性。AOA 和 AOB 对盐度波动响应并不一致: AOA 偏爱中盐度环境, 而 AOB 则更喜低盐度环境。盐度和 pH 造成的土壤氮素有效性的变化可能是影响滨海盐土硝化活性和微生物丰度及群落组成的核心因素。

参考文献:

[1] Dendooven L, Alcántara-Hernández R J, Valenzuela-Encinas C, et al. Dynamics of carbon and nitrogen in an extreme alkaline saline soil: A review[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(6): 865–877.

[2] 张先富, 李卉, 洪梅, 等. 苏打盐碱土对氮转化的影响[J]. *吉林大学学报(地球科学版)*, 2012, 42(4): 1145–1150.

[3] Reddy N, Crohn D M. Effects of soil salinity and carbon availability from organic amendments on nitrous oxide emissions[J]. *Geoderma*, 2014, 235/236: 363–371.

[4] 李红强, 姚荣江, 杨劲松, 等. 盐渍化对农田氮素转化过程的影响机制和增效调控途径[J]. *应用生态学报*, 2020, 31(11): 3915–3924.

[5] Gubry-Rangin C, Nicol G W, Prosser J I. Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 74(3): 566–574.

[6] Bernhard A E, Donn T, Giblin A E, et al. Loss of diversity

of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(9): 1289–1297.

[7] Sahan E, Muyzer G. Diversity and spatio-temporal distribution of ammonia oxidizing archaea and bacteria in sediments of the Westerschelde estuary. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64: 175–186.

[8] Mosier A C, Francis C A. Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing Archaea and bacteria in the San Francisco Bay Estuary[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3002–3016.

[9] 李寒, 张晓黎, 郭晓红, 等. 滨海盐渍化土壤中蓝细菌多样性及分布[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(5): 957–967.

[10] Kurolo J, Salkinoja-Salonen M, Aarnio T, et al. Activity, diversity and population size of ammonia-oxidizing bacteria in oil-contaminated landfarming soil[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 250(1): 33–38.

[11] B.A.科夫达, B.C.穆娜朵娃, B.B.戈洛夫, B.И.施特尔戈洛夫, 祝寿泉. 按盐渍化程度和性质并结合植物耐盐性而拟定的土壤分类[J]. *土壤*, 1962(3): 59–62.

[12] 李二焕, 沈俊, 鞠靖, 等. 苏北滨海盐土区河流入海口土壤盐分及养分分布特征[J]. *中国水土保持科学*, 2016, 14(1): 79–88.

[13] Bernhard A E, Tucker J, Giblin A E, et al. Functionally distinct communities of ammonia-oxidizing bacteria along an estuarine salinity gradient[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(6): 1439–1447.

[14] Li J L, Nedwell D B, Beddow J, et al. *AmoA* Gene abundances and nitrification potential rates suggest that benthic ammonia-oxidizing bacteria and not Archaea dominate N cycling in the Colne Estuary, United Kingdom[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 159–165.

[15] Meyer R L, Kjær T, Revsbech N P. Use of NO_x -microsensors to estimate the activity of sediment nitrification and NO_x -consumption along an estuarine salinity, nitrate, and light gradient[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2001, 26: 181–193.

[16] Magalhães C M, Joye S B, Moreira R M, et al. Effect of salinity and inorganic nitrogen concentrations on nitrification and denitrification rates in intertidal sediments and rocky biofilms of the Douro River Estuary, Portugal[J]. *Water Research*, 2005, 39(9): 1783–1794.

[17] Rysgaard S, Thastum P, Dalsgaard T, et al. Effects of salinity on NH_4^+ adsorption capacity, nitrification, and denitrification in Danish estuarine sediments[J]. *Estuaries*, 1999, 22(1): 21.

[18] Hatzenpichler R, Lebedeva 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 the United States of America*, 2008, 105(6): 2134–2139.

[19] Bollmann A, Laanbroek H J. Influence of oxygen partial pressure and salinity on the community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the Schelde Estuary[J].

- Aquatic Microbial Ecology, 2002, 28: 239–247.
- [20] Jiang X J, Hou X Y, Zhou X, et al. pH regulates key players of nitrification in paddy soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 81: 9–16.
- [21] Sahrawat K L. Factors affecting nitrification in soils[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2008, 39(9/10): 1436–1446.
- [22] Halling-Sorensen B, Jorgensen S E. *Studies in environmental science*[M]. Elsevier, 1993: 55–118.
- [23] Nicol G W, Leininger S, Schleper C, et al. 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.
- [24] Yao H Y, Campbell C D, Chapman S J, et al. Multi-factorial drivers of ammonia oxidizer communities: Evidence from a national soil survey[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(9): 2545–2556.
- [25] Puthiya Veetil V, Abdulaziz A, Chekidhenkuzhiyil J, et al. Bacterial domination over Archaea in ammonia oxidation in a monsoon-driven tropical estuary[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 69(3): 544–553.
- [26] Bernhard A E, Landry Z C, Blevins A, et al. Abundance of ammonia-oxidizing Archaea and bacteria along an estuarine salinity gradient in relation to potential nitrification rates[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(4): 1285–1289.
- [27] Martens-Habbena W, Berube P M, Urakawa H, et al. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria[J]. *Nature*, 2009, 461(7266): 976–979.
- [28] Sahan E, Muyzer G. Diversity and spatio-temporal distribution of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in sediments of the Westerschelde Estuary[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64(2): 175–186.
- [29] Song Y J, Zhang X L, Ma B, et al. Biochar addition affected the dynamics of ammonia oxidizers and nitrification in microcosms of a coastal alkaline soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, 50(2): 321–332.