

南方典型母质发育稻田土壤氨氧化细菌和古菌群落结构特征^①

俎诗佩¹, 彭德元², 王振华², 刘毅³, 秦红灵³, 张俊忠^{1*}

(1 云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 西南林业大学林学院, 昆明 650224; 2 湖南省烟草公司张家界市公司, 湖南张家界 427099;
3 中国科学院亚热带农业生态研究所亚热带农业生态过程重点实验室, 长沙 410125)

摘要: 依托中国科学院桃源农业生态试验站水稻土易地置土长期定位试验, 以广东英利(YL, 发育于玄武岩风化物)、江西鹰潭(YT, 发育于第四纪红黏土)和湖南桃源古市(TYG, 发育于河流冲积物)3种母质发育稻田土壤为供试土壤, 采用常规土壤农化分析方法测得3种土壤的理化性质、硝化速率, 并结合实时荧光定量PCR技术和Illumina MiSeq测序技术, 分析了土壤氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)种群丰度及群落结构的异同。结果表明: 土壤硝化速率除分蘖期外, 均表现为: YT>YL>TYG。YL与YT土壤中AOA数量占主导地位, AOA/AOB比值分别在0.72~3.05、0.98~1.52; TYG土壤中AOB数量占主导地位, AOA/AOB比值在0.21~0.75。群落组成方面, 不同母质土壤间AOA、AOB群落结构差异显著, 3种土壤AOA优势菌属各不相同, AOB优势菌属均为*Nitrosospira*。冗余分析表明, pH和可溶性有机碳是造成AOA、AOB群落结构差异的核心因子。综上, 在环境背景均统一的前提下, 不同母质发育稻田土壤理化性质之间依旧存在差异, 这种差异影响着氨氧化微生物AOA、AOB的丰度以及群落结构。

关键词: 土壤母质; 稻田土壤; 氨氧化细菌; 氨氧化古菌

中图分类号: S154.36 文献标志码: A

Community Structure Characteristics of Ammonia-oxidizing Bacteria and Archaea in Paddy Soil with Different Parent Materials in Southern China

ZU Shipei¹, PENG Deyuan², WANG Zhenhua², LIU Yi³, QIN Hongling³, ZHANG Junzhong^{1*}

(1 Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Province, Faculty of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2 Zhangjajie City Company, Hunan Tobacco Company, Zhangjajie, Hunan 427099, China; 3 Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract: Relying on the long-term positioning experiment of rice soil ex-situ soil of the Taoyuan Agricultural Ecology Experimental Station of the Chinese Academy of Sciences, three paddy soils derived from different parent materials were selected from Yingli in Guangdong Province (YL, basalt weathering material), Yingtan in Jiangxi Province (YT, quaternary red clay material) and Taoyuan in Hunan Province (TYG, river alluvium material), physicochemical properties and nitrification rates were measured using conventional agrochemical soil analysis methods, and the similarities and differences in ammonia-oxidizing archaea(AOA) and ammonia-oxidizing bacteria(AOB)gene abundances and community structure were analyzed using real-time quantitative PCR and Illumina MiSeq sequencing. The results showed nitrification rate was presented as YT>YL>TYG except at tillering stage. And the abundance of AOA dominated in YL and YT, with AOA/AOB ratios between 0.72 and 3.05 and 0.98 and 1.52, respectively. In TGY, the abundance of AOB was dominant, with an AOA/AOB ratios between 0.21 and 0.75. Parent material has a significant influence on AOA and AOB community structure, the predominant genera were different in AOA while *Nitrosospira* dominant in AOB with three soils. The redundancy analysis (RDA) showed that pH and DOC were the most important factors influencing AOA and AOB community structure. In conclusion, there are differences in the physicochemical

^①基金项目: 国家自然科学基金面上项目(42377135), 湖南省自然科学基金面上项目(2022JJ30647), 湖南省烟草公司张家界市公司项目(202103)和云南省一流学科林学学科、云南省一流专业林学专业建设经费项目资助。

* 通讯作者(zhangjunzhong@foxmail.com)

作者简介: 俎诗佩(1998—), 女, 山西吕梁人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物生态、碳氮循环相关微生物研究。E-mail: 1294385782@qq.com

properties in paddy soils derived from different parent materials in the same environment, which affects the abundance and community structure of AOA and AOB.

Key words: Soil parent material; Paddy soil; Ammonia-oxidizing bacteria; Ammonia-oxidizing archaea

硝化作用是稻田土壤氮循环关键过程之一,包括NH₄⁺氧化为NO₂⁻、NO₂⁻转化为NO₃⁻[1]两个步骤,均由微生物驱动。硝化作用产生的硝酸盐不仅可经淋失造成肥力损失和地下水污染^[2],还可经反硝化作用产生温室气体N₂O^[3],加速气候变暖。因此,明确稻田土壤硝化作用机理对研究稻田氮素损失减量及N₂O减排具有重要科学意义。

氨氧化反应是硝化作用的起始和限速步骤,由氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)和氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)驱动^[4]。氨氧化微生物的丰度和群落结构受底物浓度和多种土壤理化性质影响。研究表明,pH是决定氨氧化微生物AOA、AOB生态位分化的关键因子,由于对环境的偏好性,AOA在酸性条件下活性较强,AOB则在碱性条件下能够更好地生存,且AOA、AOB主要功能类群在pH不同的土壤中也存在较大差异^[4-6];除pH外,氮的添加也会影响土壤AOB的群落结构,AOA与AOB在不同氮素水平下的生长状况不同^[4]。此外,在稻田生态系统中,温度会通过改变相关酶活性进而影响AOA与AOB的功能活性、相对丰度以及群落结构^[7],施肥^[8]、水稻种植^[9]等田间管理措施也会影响AOA与AOB的分布。

南方地区是我国水稻主产区之一,分布着由多种母质发育而来的水稻土。研究表明,土壤母质是决定土壤养分丰缺和理化分异的关键因子^[10],也决定着土壤微生物丰度和结构特征^[11]。目前,关于AOA和AOB在不同类型稻田土壤中的分布特征已有少量报道,然而,这些研究主要集中于不同地区不同类型的稻田土壤。由于研究之间不同地区气候条件、种植模式、施肥制度和水稻品种等方面均存在差异,因而难以系统地比较分析不同类型稻田土壤AOA和AOB群落结构的分布规律及应答特征。

基于此,本研究依托中国科学院桃源农业生态试验站原状水稻土易地置土长期定位试验,选取广东英利的砖红壤、江西鹰潭的第四纪红壤和湖南桃源古市的河流冲积物3种母质发育的稻田土壤为研究对象,利用实时荧光定量PCR和Illumina MiSeq测序等分子生物学技术,在早稻种植期间(全程淹水种植),系统监测3种水稻土关键理化因子、硝化速率及AOA和AOB丰度

和群落组成的动态变化规律,以及它们之间的内在联系,系统揭示我国南方具有区域代表性的3种母质发育稻田土壤AOA和AOB的分布特征和硝化潜力及群落结构形成核心驱动因子。研究结果对提高稻田氮素利用效率和减少N₂O排放具有重要的科学意义。

1 材料与方法

1.1 供试样点及样品采集

中国科学院桃源农业生态试验站原状水稻土易地置土长期定位试验设置于2010年底,是将广东英利的砖红壤、浙江嘉兴和湖南桃源古市的河流冲积物、江西鹰潭和湖南桃源宝洞峪的第四纪红壤母质发育的5种水稻土置于桃源农业生态试验站的同一田块(各含3个重复)。每个微区的原状土柱长×宽×高为1.4 m×1.4 m×0.7 m。2011年至今,按照当地水稻种植模式种植双季稻。稍有调整的是,为了防止原状土柱开裂造成养分流失等问题,本长期定位试验一直淹水处理。本研究在2018年早稻种植期间选取了该长期定位试验田中广东英利的砖红壤(YL)(20°33' N, 110°04' E)、江西鹰潭的第四纪红壤(YT)(28°12' N, 116°56' E)和湖南桃源古市的河流冲积物(TYG)(28°55' N, 111°26' E)3种母质发育土壤作为研究对象。2018年测得YL土壤基本理化性质为:全氮1.06 g/kg、全磷1.04 g/kg、全钾4.24 g/kg、有机质20.25 g/kg;YT土壤基本理化性质为:全氮1.21 g/kg、全磷0.71 g/kg、全钾15.4 g/kg、有机质22.15 g/kg;TYG土壤基本理化性质为:全氮2.15 g/kg、全磷0.72 g/kg、全钾22.67 g/kg、有机质18.82 g/kg。3种土壤于4月28日按每亩(1亩=667 m²)施入25 kg过磷酸钙(含P₂O₅ 120 g/kg)、5 kg氯化钾(含K₂O 600 g/kg)、11.5 kg尿素(含N 460 g/kg)后移栽早稻(品种为中早35),并于5月4日按每亩施入8 kg尿素进行追肥。分别在4月26日未施肥期、5月6日水稻返青期、5月20日分蘖期和6月4日孕穗期采集土样。每小区选取前中后三段,每段采用五点取样法采集土样(0~20 cm)后混匀,每个时期各取3个重复。去除土壤中杂草、石块等杂质,一部分立即用于理化性质和硝化速率测定,另一部分储存在-80℃冰箱用于分子生物学指标测定。

1.2 土壤理化性质的测定

土壤 pH 采用 pH 计(Mettler-toledo320, 上海)按水土质量比 2.5 : 1 测定, 土壤 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 含量采用 0.5 mol/L K_2SO_4 溶液浸提后流动注射分析仪(AA3, 德国 SEAL, 中国)测定; 土壤可溶性有机碳(DOC)采用 0.5 mol/L K_2SO_4 浸提后可溶性有机碳分析仪(Analytik Jena, 德国)测定。

1.3 土壤硝化速率的测定

土壤硝化速率采用 Kurola 等^[12]的方法测定, 并稍作修改。称取 5 g 鲜土于 50 mL 离心管中培养, 加入 20 mL(1 mmol/L)磷酸缓冲液(内含 1 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 50 mg/L KClO_3 抑制亚硝酸盐氧化), 在 25℃ 黑暗处 180 r/min 振荡培养 24 h。培养结束后加 5 mL 1 mol/L KCl 提取 NO_2^- 后进行离心, 用紫外分光度法测定上清液中 NO_2^- -N 含量。以培养 24 h 内每小时 NO_2^- -N 浓度的净增加量作为土壤硝化速率。

1.4 土壤 DNA 提取及荧光定量 PCR 分析

采用 FastDNA® Spin Kit For Soil(MP Biomedicals, 美国)试剂盒提取土壤 DNA。称取 0.5 g 经冷冻干燥研磨后的土壤样品, 按照试剂盒操作步骤进行土壤 DNA 提取。用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 UV-Vis 分光光度计(NanoDrop-1000, 德国)检测提取的 DNA 质量和浓度。选取特异性引物 *amoA-1F/amoA-2* 和 *Arch-amoAF/Arch-amoAR*^[13] 对 AOB *amoA*、AOA *amoA* 基因进行荧光定量 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μL , 包括 10 μL SYBR-Green II(Takara), 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , DNA 模板(10 倍稀释)2 μL , 并用 RNase-Free Water 补足至 20 μL 。PCR 程序为: 95 ℃ 预变性 2 min; 95 ℃ 变性 15 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 32 s, 40 个循环。溶解曲线过程为 95 ℃ 15 s, 55 ℃ 30 s, 90 ℃ 15 s。标准曲线采用含有 AOB 和 AOA 的 *amoA* 基因质粒, 按 10 倍梯度稀释制作。扩增效率为 95% ~ 107%, R^2 为 0.997。

1.5 Illumina MiSeq 高通量测序

使用 PCR 扩增 AOB *amoA*、AOA *amoA* 基因, 所用反应体系和引物参考李高洋等^[14]的方法, 所得 PCR 产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 采用 AxyPrep DNA kit 凝胶回收试剂盒(Axygen, California, 美国)切胶回收, 将 PCR 产物送至上海美吉生物医药科技有限公司进行 Illumina MiSeq 测序。随后按照 97% 的相似性对序列进行聚类^[5], 最终得到 AOB *amoA* 和 AOA *amoA* 基因的 OTU(最小分类单

元)代表序列。MiSeq 测序得到的是双端序列数据, 每个样品每个功能基因至少获得 3 万条有效序列, 原始测序数据上传至 NCBI(National Center for Biotechnology Information, 美国国家生物技术信息中心), 数据库登录号为 PRJNA673573、PRJNA673810、PRJNA674907。

1.6 数据处理与统计分析

使用软件 SPSS 25.0 对土壤理化性质、硝化速率、AOA 和 AOB 基因丰度进行单因素方差分析(One-way ANOVA)、独立样本 t 检验(Independent samples t-test)与 Pearson 相关性分析。使用 R studio Function 数据分析包对 AOA 和 AOB 群落结构进行置换多元方差分析(Permanova analysis)。使用 OriginPro 2022 软件绘图。使用 Canoco 5 软件对数据进行冗余分析(Redundancy analysis, RDA)。使用 MEGA-X 软件的邻接方法(Neighbor-joining)构建包含优势 OTU 代表性序列及其相似序列的系统发育树。

2 结果与分析

2.1 不同母质发育稻田土壤理化性质的差异

早稻生育期间 3 种母质发育稻田土壤理化性质存在显著差异(图 1)。3 种土壤的 pH 在 4 个时期一直呈酸性, 均表现为: TYG>YL>YT。YL 土壤 DOC 含量显著高于 YT 与 TYG($P<0.05$)。TYG 土壤的 NH_4^+ -N 含量在各生育期显著高于 YT 与 YL($P<0.05$)。YL 土壤 NO_3^- -N 含量在分蘖期和孕穗期显著高于其他处理($P<0.05$)。

2.2 不同母质发育稻田土壤硝化速率和硝化微生物丰度的差异

3 种母质发育稻田土壤硝化速率差异显著(图 2), 除孕穗期外, 均表现为: YT>YL>TYG($P<0.05$)。不同母质土壤 AOA 和 AOB 丰度也具有显著差异($P<0.05$)(图 3), 在水稻生长期间, YL 与 YT 土壤中 AOA 数量占主导地位, 其 AOA 丰度值分别为 3.25×10^7 ~ 5.5×10^7 、 3.06×10^7 ~ 6.21×10^7 copies/g, AOB 丰度值分别为 1.27×10^7 ~ 4.61×10^7 、 2.2×10^7 ~ 5.22×10^7 copies/g, AOA/AOB 比值分别在 0.72 ~ 3.05、0.98 ~ 1.52; TYG 土壤中 AOB 数量占主导地位, 其 AOA 丰度值为 1.37×10^7 ~ 3.86×10^7 copies/g, AOB 丰度值为 4.28×10^7 ~ 9.82×10^7 copies/g, AOA/AOB 比值在 0.21 ~ 0.75。Pearson 相关分析(表 1)表明, pH 与 AOA 丰度具有极显著负相关性($P<0.01$), pH、 NH_4^+ -N 含量与 AOB 丰度具有极显著正相关性($P<0.01$), 硝化速率与 AOA 丰度具有极显著正相关性($P<0.01$)。

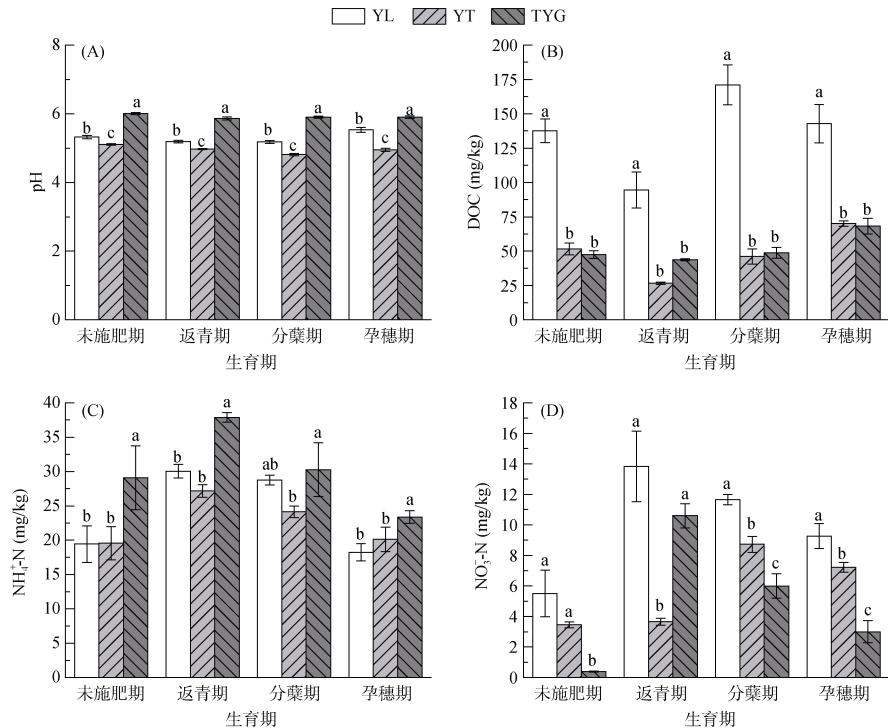
(图中误差线为标准差; 图中小写字母不同代表同一时期不同土壤样品间差异显著 $P<0.05$; 下同)

图 1 不同母质发育稻田土壤水稻各生育期理化性质

Fig. 1 Physiochemical properties of paddy soils derived from different parent materials during different rice growth stages

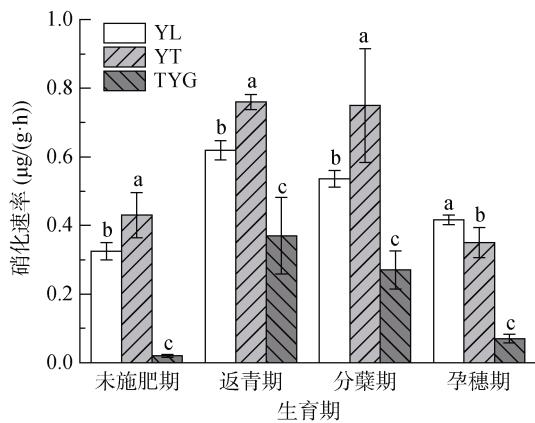


图 2 不同母质发育稻田土壤水稻各生育期硝化速率

Fig. 2 Nitrification rates of paddy soils derived from different parent materials during different rice growth stages

2.3 不同母质发育稻田土壤 AOA 和 AOB 多样性指数的差异

由表 2 可知, 在早稻生长期, 3 种土壤 AOA Shannon 指数表现为 YT>TYG>YL, 且差异达显著水平($P<0.05$), 说明 YT 土壤 AOA 物种多样性最高; TYG 土壤 Chao 指数最大, 说明 TYG 土壤中物种丰富度较高。YT 土壤 AOB Shannon 指数与其余两种土壤相比显著降低($P<0.05$), 且除孕穗期外其 Chao 指数也最小, 但差异未达到显著水平($P>0.05$)。从 Pearson 相关性分析结果可以看出(表 1), AOA 和 AOB 的 Shannon 指数、AOA 的 Chao 指数与所有土壤因子均无显著相关性($P>0.05$), 仅 AOB 的 Chao 指数与 NO_3^- -N 含量表现出显著正相关关系($P<0.05$)。

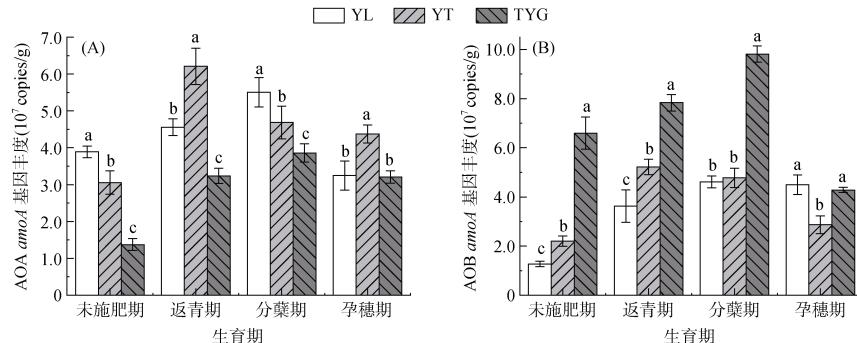


图 3 不同母质发育稻田土壤水稻各生育期 AOA (A) 和 AOB (B) 基因丰度

Fig. 3 Abundance of AOA (A) and AOB (B) of paddy soils derived from different parent materials during different rice growth stages

表 1 不同母质发育稻田土壤 AOA、AOB 基因丰度、多样性指数与理化指标、硝化速率的相关性

Table 1 Pearson correlations of gene abundance of AOA and AOB, AOA and AOB diversity indexes, soil physiochemical properties, and nitrification rates of paddy soils derived from different parent materials

	DOC	pH	$\text{NH}_4^+ \text{-N}$	$\text{NO}_3^- \text{-N}$	硝化速率
AOA 丰度	0.16	-0.68**	0.02	0.41*	0.77**
AOB 丰度	-0.39**	0.59**	0.67**	-0.01	-0.17
AOA Shannon 指数	-0.16	0.453	-0.106	-0.33	-0.31
AOA Chao 指数	-0.16	0.50	0.26	-0.35	-0.36
AOB Shannon 指数	0.01	-0.38	0.24	0.37	0.20
AOB Chao 指数	-0.11	-0.57	0.15	0.65*	0.45

注: *、**分别表示在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 水平显著相关。

表 2 不同母质发育稻田土壤水稻各生育期 AOA、AOB 多样性指数

Table 2 Diversity indexes of AOA and AOB in paddy soils derived from different parent materials during different rice growth stages

生育期	处理	AOA		AOB	
		Shannon 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Chao 指数
未施肥期	YL	0.88 ± 0.04 b	15.67 ± 2.49 a	1.64 ± 0.40 a	365.26 ± 50.00 a
	YT	1.65 ± 0.07 a	13.50 ± 2.48 a	0.06 ± 0.03 b	151.69 ± 87.99 b
	TYG	1.56 ± 0.23 a	18.33 ± 3.77 a	1.09 ± 0.19 a	184.54 ± 96.82 ab
返青期	YL	0.91 ± 0.02 c	10.00 ± 0.82b	1.59 ± 0.21 a	235.67 ± 113.44 b
	YT	1.74 ± 0.08 a	13.33 ± 2.05 ab	0.38 ± 0.35 b	217.65 ± 23.51 b
	TYG	1.44 ± 0.04 b	15.17 ± 2.66 a	1.57 ± 0.26 a	445.80 ± 41.29 a
分蘖期	YL	0.87 ± 0.04 c	10.78 ± 2.51a	0.95 ± 0.53 a	246.65 ± 66.75 a
	YT	1.78 ± 0.07 a	12.67 ± 1.70 a	0.37 ± 0.19 b	211.57 ± 20.07 a
	TYG	1.43 ± 0.05 b	16.33 ± 2.87 a	0.83 ± 0.09 a	246.16 ± 137.69 a
孕穗期	YL	0.88 ± 0.03 c	11.33 ± 2.49 a	1.13 ± 0.28 a	251.08 ± 155.08 a
	YT	1.72 ± 0.09 a	11.83 ± 1.43 a	0.53 ± 0.29 b	231.05 ± 137.46 a
	TYG	1.48 ± 0.10 b	15.33 ± 2.87 a	1.26 ± 0.29 a	332.12 ± 24.39 a

注: 表中小写字母不同代表同一时期不同土壤样品间差异显著 $P<0.05$ 。

2.4 不同母质发育稻田土壤 AOA 和 AOB 群落的差异

选取 3 种母质发育稻田土壤早稻生长期 AOA 和 AOB 的优势 OTU($>1\%$)进行分析。从图 4A 直方图中可以看出, 不同母质发育稻田土壤 AOA 优势 OTU 各不相同。其中, YL 稻田土中, OTU66 与 OTU3 在早稻生长期均为优势序列, 通过与 NCBI 数据库比对发现, OTU66 属于 *Nitrosocosmicus*, OTU3 属于 *Thaumarchaeota*(奇古菌门); YT 土壤优势序列为 OTU5, 与已知来自草地或花园土壤中的 *Nitrososphaera*(亚硝化螺旋菌属)有 99% 相似度; TGY 土壤优势序列为 OTU6, 与一种来自淡水水族馆生物过滤器的 *Nitrosotenuis*(细小亚硝化菌属)有 66% 相似度。由图 4B 可知, 早稻生长期 OTU1041 在 YT 和 TGY 两

种土壤中均为优势序列, 相对丰度分别达 88.4% ~ 99.4%、64.6% ~ 83.5%。同时, OTU1041 在 YL 土壤中随生育期的进行逐渐表现出主导地位。AOB 系统发育树结果显示(图 5B), OTU1041 与 *Nitrosospira*(亚硝化螺旋菌属)有较高相似度(95%)。PERMANOVA 分析(表 3)进一步补充说明, 不同母质发育稻田土壤 AOA 和 AOB 群落结构均存在极显著差异($P<0.01$)。

对 AOA 和 AOB 群落组成与环境变量进行 RDA 分析发现, 两个排序轴共同解释了 AOA、AOB 样本 79.27%、34.75% 的变异(图 6)。相同母质不同时期稻田土壤很明显聚为一类, 表明不同母质土壤氨氧化微生物群落结构彼此差异较大, 且采样时间对群落结构影响不明显。pH 和 DOC 对氨氧化微生物群落结构的影响显著($P<0.05$)。

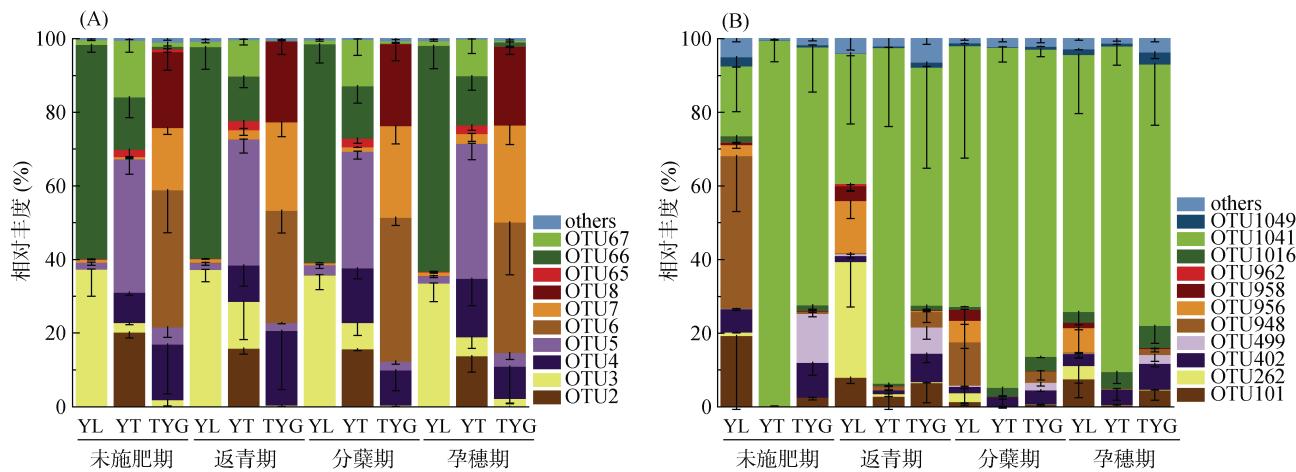


图 4 不同母质发育稻田土壤各生育期 AOA(A) 和 AOB(B) 群落组成

Fig. 4 Community compositions of AOA (A) and AOB (B) in paddy soils derived from different parent materials during different rice growth stages

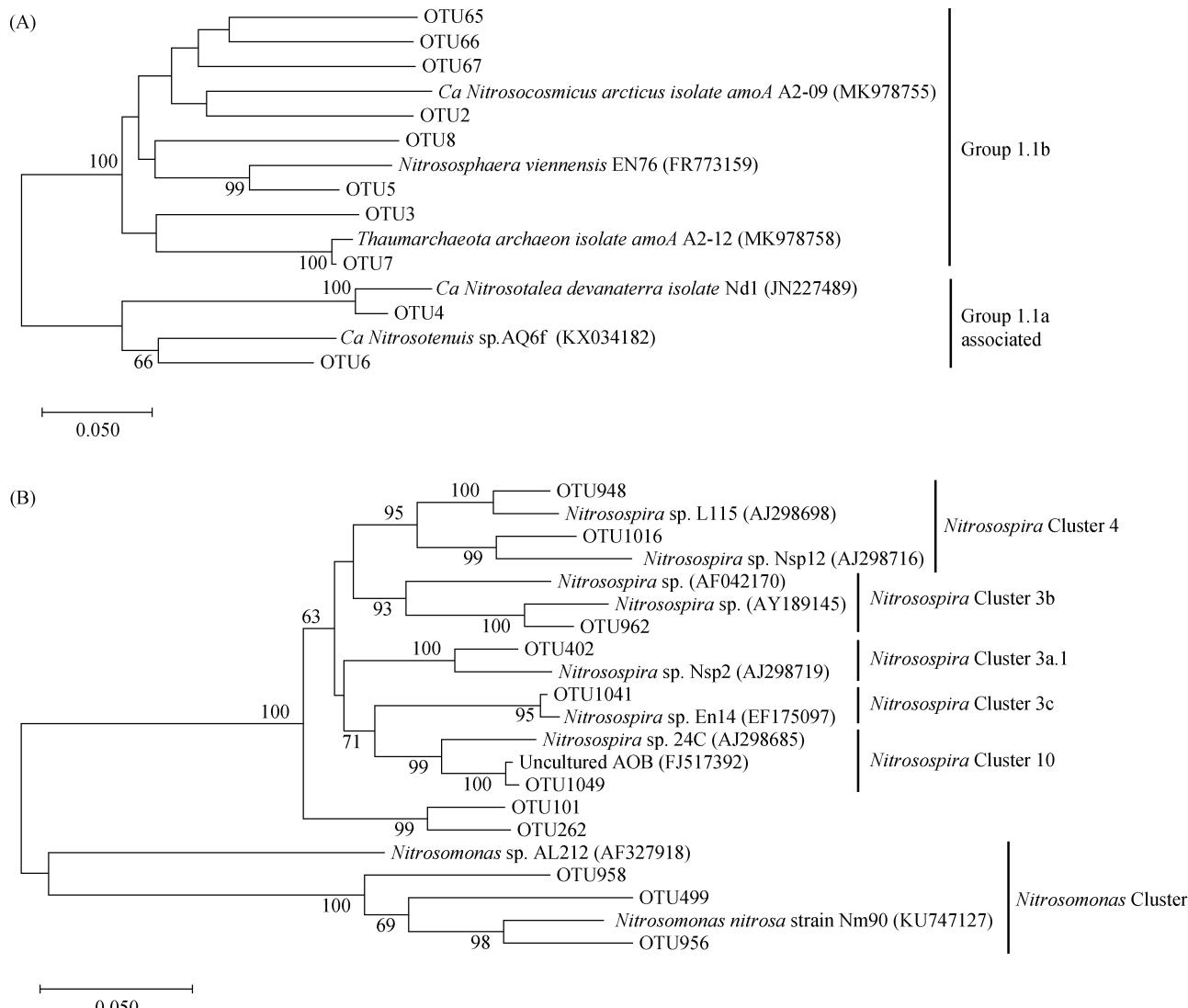


图 5 AOA(A)、AOB(B)优势 OTU 系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree of dominant OTUs of AOA(A)and AOB(B)

表 3 不同母质发育稻田土壤 AOA、AOB 群落结构 PERMANOVA 分析

Table 3 PERMANOVA analysis of community structures of AOA and AOB

硝化微生物	Pairs	R ² 值	P 值
AOA	YL/YT/TYG	0.94	0.001
AOB	YL/YT/TYG	0.36	0.001

3 讨论

3.1 不同母质发育稻田土壤对 AOA 和 AOB 丰度及硝化速率的影响

砖红壤、第四纪红壤和河流冲积物母质发育的稻田土壤是我国南方水稻主产区代表性土壤。本研究中，在气候条件、种植模式、施肥制度和水稻品种均统一的环境背景下，YL、YT 和 TYG 三种母质发育稻田土壤的理化性质依然存在差异(图 1)，这表明母质在很大程度上影响着多种土壤理化性质。土壤形成的物质基础是母质，其天然的特性会对土壤的养分状况和理化性质有着显著的影响^[10]，且这种影响并没有由于种植环境背景的统一而逐渐消除。有研究表明

由母质引起的土壤理化因素之间的差异会间接影响微生物丰度^[11]。YL 与 YT 土壤中 AOA 数量占主导地位，TYG 土壤中 AOB 数量占主导地位(图 2)，且 Pearson 相关性分析结果表明，AOA 与 AOB 丰度与 pH 分别存在极显著负相关和极显著正相关关系($P < 0.01$)。这是由于 YL 与 YT 土壤更偏酸性，AOA 为专性嗜酸菌，在偏酸性土壤中，AOA 具有独特的生物化学及遗传学特征，能适应低 pH 的环境^[15]。¹³CO₂-DNA-SIP 试验中发现，¹³C 标记的碳源在酸性环境中对 AOA 而非 AOB 存在显著同化，也进一步有力地证明了 AOA 在酸性土壤氨氧化中的主导作用，加上 AOA 活跃的自养硝化活性，为其在酸性环境中的主导作用提供了直接证据^[15]。且许多分子研究表明，在多种酸性土壤中，AOA 在数量上优于 AOB^[16-18]。TYG 土壤 NH₄⁺-N 含量显著高于 YL 与 YT($P < 0.05$)，在寡营养环境中，例如底物浓度(氨)较低的环境中，AOA 对氨的亲和力约为 AOB 的 200 倍^[19]，因此 AOA 偏爱低 NH₄⁺-N 环境，AOB 则在氮素较富集土壤中较为活跃^[20]，这可能是 AOB 在 TYG 土壤中占比较大的原因。

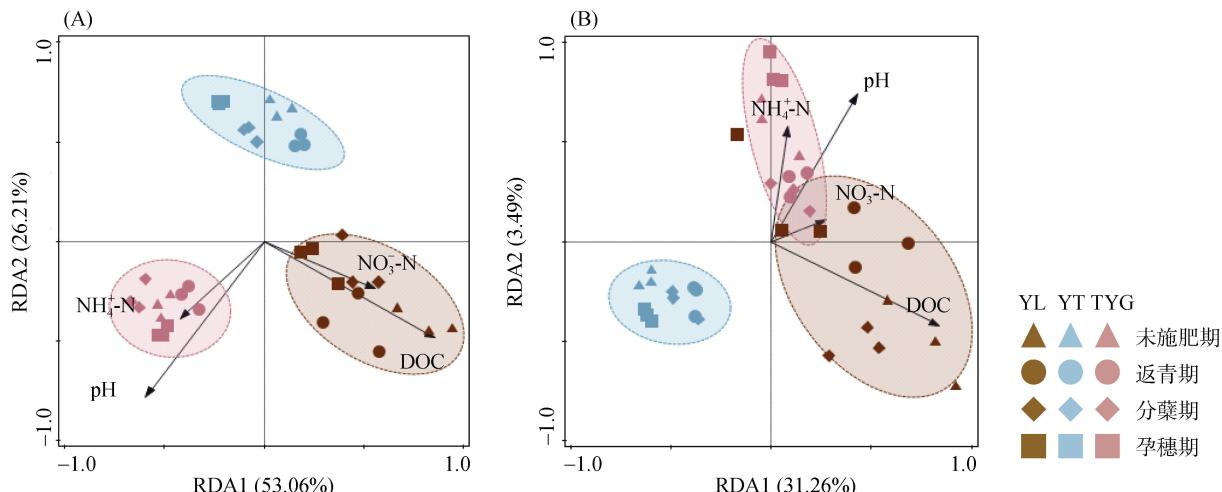


图 6 不同母质发育稻田土壤 AOA(A)、AOB(B)群落组成和理化因子的冗余分析

Fig. 6 Redundancy analysis of AOA (A) and AOB (B) community compositions and soil properties in paddy soils derived from different parent materials

Pearson 相关性分析结果表明，硝化速率与 AOA 丰度存在显著正相关关系，与 AOB 丰度无显著相关性(表 1)。这与 He 等^[16]在中国南方酸性红壤(pH 3.7~6.0)进行的长期施肥试验，以及 Yao^[17]等在苏格兰的一项全国土壤调查(共 713 个样本)中的结果相似。有研究发现，AOB 群落较稳定，不受硝化速率显著变化的影响^[21]，这可能是硝化速率与 AOB 丰度无显著相关性的原因。但 AOB 中存在多个 *amoA* 基因拷贝，AOA 在细胞中是否含有一个以上的 *amoA* 基因拷贝

还不确定^[22]，此外，AOA 细胞的体积通常比 AOB 小 10~100 倍，而且 AOA 的氨氧化速率更低^[23]，因此，AOA、AOB 丰度与硝化速率数值上的相关性并不一定等同于二者对原位硝化的功能重要性。AOA 和 AOB 丰度与硝化速率之间是否存在潜在相关性还需进一步深入研究。

3.2 不同母质发育稻田土壤对硝化微生物群落组成的影响

本研究发现，不同母质发育稻田土壤 AOA、AOB

多样性指数、群落组成均存在显著差异。其中, AOA 优势菌属各不相同, YT 土壤中, AOA 优势菌属为 *Nitrososphaera* (亚硝化螺菌属)。研究发现, *Nitrososphaera* 是酸性土壤中氨氧化作用的重要驱动者^[5,24], 这可能是因为其具备一种独特的代谢能力, 可缓解 pH 较低环境对它的毒害作用。*Nitrosotenuis* (细小亚硝化菌属)主要在河流、河口和深水湖泊分布^[25], 这与本研究中同为河流冲积物母质的 TYG 土壤优势菌属结果一致, 同时 *Thaumarchaeota*(奇古菌门)在酸性土壤中也广泛分布^[26]。在相同种植环境背景下, 3 种不同母质发育稻田土壤 AOA 优势菌属各不相同, 这也充分体现了母质对 AOA 群落结构存在显著影响以及酸性土壤氨氧化过程的复杂性和氨氧化微生物的多样性。 β 变形菌门被认为在土壤 AOB 中占主导地位, 其中两个主要类群为 *Nitrosomonas*(亚硝化单胞菌属) 和 *Nitrosospira*(亚硝化螺旋菌属)。*Nitrosospira* 更偏好酸性土壤^[27], 是酸性土壤中的优势菌属, 本研究结果与之相符合。*Nitrosomonas* 在酸性土壤中很少见, 通常分布于中性或碱性土壤中^[6,27], 这也是它在本研究 3 种酸性土壤中占比较少的原因。RDA 分析结果表明, pH 和 DOC 含量是驱动氨氧化微生物 AOA、AOB 群落结构的关键因子, 其中 DOC 影响较大。有研究发现, 土壤 pH 可以通过改变氨的生物有效性来影响氨氧化微生物的群落结构^[28], 且不同 pH 环境条件下, AOA、AOB 主要功能类群也不同^[5-8]。宋延静等^[20]也认为土壤 pH 对稻田氨氧化菌群落结构的形成起着重要作用。Marschner^[29]发现细菌群落结构受土壤有机碳含量的显著影响, 这可能是由于 DOC 中容易分解的化合物如有机酸和碳水化合物可能主要被土壤细菌利用的结果。这说明即使在相同的种植环境背景下, 由地域和成土母质因素长期影响所造成的土壤理化性质及养分的差异, 仍然会导致 AOA、AOB 群落组成结构的不同, 说明母质显著影响氨氧化微生物群落结构组成。

4 结论

在气候条件、种植模式、施肥制度和水稻品种均一致的种植环境背景下, 由砖红壤、第四纪红壤和河流冲积物母质发育而来的 3 种稻田土壤, 其 pH 和 NH_4^+ -N 含量的差异导致了 3 种土壤 AOA/AOB 的丰度比值不同, pH 和 DOC 也被证明是驱动 AOA、AOB 群落结构形成的核心因子。

参考文献:

- [1] Wu Y X, Xu L G, Wang S, et al. Nitrate attenuation in low-permeability sediments based on isotopic and microbial analyses[J]. The Science of the Total Environment, 2018, 618: 15–25.
- [2] 雷钊. 拟南芥硝态氮调控突变体的筛选与鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [3] Santoro A E, Buchwald C, McIlvin M R, et al. Isotopic signature of N_2O produced by marine ammonia-oxidizing Archaea[J]. Science, 2011, 333(6047): 1282–1285.
- [4] Wang F, Liang X L, Ma S H, et al. Ammonia-oxidizing Archaea are dominant over comammox in soil nitrification under long-term nitrogen fertilization[J]. Journal of Soils and Sediments, 2021, 21(4): 1800–1814.
- [5] 李文兴, 郑曼曼, 王超, 等. 亚硝化球菌属(*Nitrososphaera*)可能是酸性土壤硝化作用的重要驱动者[J]. 土壤, 2021, 53(1): 13–20.
- [6] Li Y Y, Chapman S J, Nicol G W, et al. Nitrification and nitrifiers in acidic soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 116: 290–301.
- [7] Zeng J, Zhao D Y, Yu Z B, et al. Temperature responses of ammonia-oxidizing prokaryotes in freshwater sediment microcosms[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e100653.
- [8] Sun R B, Myrold D D, Wang D Z, et al. AOA and AOB communities respond differently to changes of soil pH under long-term fertilization[J]. Soil Ecology Letters, 2019, 1(3): 126–135.
- [9] 杨镇, 彭亮, 陶玲, 等. 种植水稻对池塘沉积物中养分和氨氧化古菌的影响[J]. 水生生物学报, 2023, 47(4): 564–571.
- [10] 毛霞丽, 邱志腾, 张爽, 等. 不同母质发育土壤团聚体分布对外源输入秸秆的响应及其与有机碳矿化的关系[J]. 环境科学, 2020, 41(6): 2842–2851.
- [11] Ulrich A, Becker R. Soil parent material is a key determinant of the bacterial community structure in arable soils[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 56(3): 430–443.
- [12] Kurola J, Salkinoja-Salonen M, Aarnio T, et al. Activity, diversity and population size of ammonia-oxidising bacteria in oil-contaminated landfarming soil[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 250(1): 33–38.
- [13] 侯海军, 秦红灵, 陈春兰, 等. 土壤氮循环微生物过程的分子生态学研究进展[J]. 农业现代化研究, 2014, 35(5): 588–594.
- [14] 李高洋, 黄永相, 吴伟健, 等. 海水稻根际效应对滨海盐碱地土壤氨氧化微生物的影响[J]. 土壤学报, 2023, 60(2): 587–598.
- [15] 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]. The ISME Journal, 2012, 6(5): 1032–1045.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 熊旭梅, 周雪, 郭佳, 等. 不同 pH 和氧气条件下土壤古菌与海洋古菌的竞争适应机制[J]. *土壤学报*, 2022, 59(3): 833–843.
- [19] Li Z P, Liu M, Wu X C, et al. Effects of long-term chemical fertilization and organic amendments on dynamics of soil organic C and total N in paddy soil derived from barren land in subtropical China[J]. *Soil and Tillage Research*, 2010, 106(2): 268–274.
- [20] 宋延静, 张晓黎, 付娆, 等. 滨海盐渍化土壤中氨氧化微生物丰度和多样性特征[J]. *土壤*, 2022, 54(6): 1157–1164.
- [21] Laverman A M, Speksnijder A G C L, Braster M, et al. Spatiotemporal stability of an ammonia-oxidizing community in a nitrogen-saturated forest soil[J]. *Microbial Ecology*, 2001, 42(1): 35–45.
- [22] Hatzenpichler R. Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing Archaea[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(21): 7501–7510.
- [23] Martens-Habbema 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.
- [24] Lin Y X, Ye G P, Luo J F, et al. *Nitrosospira* cluster 8a plays a predominant role in the nitrification process of a subtropical ultisol under long-term inorganic and organic fertilization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(18): e01031–e01018.
- [25] Ren M L, Wang J J. Phylogenetic divergence and adaptation of Nitrososphaeria across lake depths and freshwater ecosystems[J]. *The ISME Journal*, 2022, 16(6): 1491–1501.
- [26] Bomberg M, Timonen S. Distribution of cren- and euryarchaeota in Scots pine mycorrhizospheres and boreal forest humus[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 54(3): 406–416.
- [27] Song H, Che Z, Cao W C, et al. Changing roles of ammonia-oxidizing bacteria and Archaea in a continuously acidifying soil caused by over-fertilization with nitrogen[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2016, 23(12): 11964–11974.
- [28] 刘晶静, 马文丹, 和松, 等. 酸性土壤氨氧化微生物及其影响因素研究进展[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(1): 413–426.
- [29] Marschner P. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(3): 453–461.