

土地利用方式对万木林土壤氨氧化微生物丰度的影响^①

黄蓉^{1,2}, 张金波¹, 钟文辉³, 贾仲君¹, 蔡祖聪^{1*}

(1 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; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049;

3 南京师范大学化学与环境科学学院, 南京 210097)

摘要: 以我国亚热带地区典型花岗岩发育酸性红壤为研究对象, 选取福建建瓯万木林自然保护区封禁保护下 5 种自然植被和 1 种人工种植植被土壤, 采用荧光实时定量 PCR (Real-time PCR) 技术测定了土壤氨氧化细菌 (AOB) 和氨氧化古菌 (AOA) 的群落丰度, 采用 ¹⁵N 稳定同位素成对标记和数值模型相结合的方法测定了土壤初级硝化速率。结果显示, 长期封禁保护下的自然植被土壤 pH 低, 土壤 AOB 数量偏低。人为种植和管理显著提高了土壤 pH, 促进了 AOB 的生长, 其丰度比自然条件下提高了 2 个数量级, 土壤初级硝化速率也显著提高, 并与 AOB 数量存在显著的相关性, 表明 AOB 是硝化作用的主要贡献者。5 种自然植被条件下 AOA 的 *amoA* 基因拷贝数占古菌 16S rRNA 基因的比例都小于 1% (0.01%~0.64%), 在农业利用方式下上升到 5.32%, 表明并非所有古菌都具备氨氧化功能基因 *amoA*, 氮肥施用可能促进了氨氧化古菌的生长。

关键词: 酸性红壤; 氨氧化微生物丰度; 荧光实时定量 PCR; ¹⁵N 稳定同位素标记

中图分类号: S154.36; X172

硝化作用是指铵态氮转化为亚硝态氮及硝态氮的生物氧化过程, 是全球氮循环的主要过程之一^[1]。硝化过程分两步进行: $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$ 和 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$, 前者是限速步骤。一直以来, 变形菌纲中 β 和 γ 亚纲的氨氧化细菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 被认为是自养氨氧化过程的最重要贡献者^[2]。然而, 泉古菌门中的化能自养氨氧化古菌 (ammonia-oxidizing archaea, AOA) 的发现, 将氨氧化微生物由细菌域推进到古菌域^[3]。已有的证据表明 AOA 不仅广泛分布于包括土壤在内的多种生境中^[4-5], 而且氨氧化泉古菌编码氨单加氧酶 *amoA* 基因的拷贝数可高达 β 变形菌纲细菌 *amoA* 基因的 3 000 倍^[5]。氨被认为是 AOB 的底物^[6], 也极有可能是 AOA 生理生长的底物。一般情况下, AOA 在土壤中的普遍存在和异常高的丰度表明, AOA 对氨具有独特的底物亲和性^[6]。对海洋中的 *Nitrosopumilus maritimus* 生理研究表明, 其 K_m 值为 $0.133 \mu\text{mol/L}$, 底物阈值小于 10 nmol/L , 远远低于所有已知的 AOB^[7]。最近的研究进一步支持了海洋沉积物中富含对底物具有高度亲和力的 AOA 的观点^[8]。目前尚未获得土壤 AOA 纯菌株或富集培养物, 其氨氧化动力学仍然不清楚^[9], AOA 和 AOB 对自养硝化过程

的相对贡献仍是争论的热点。采用稳定同位素示踪农田土壤氨氧化微生物核酸 DNA 的研究发现, 细菌是德国和中国典型碱性土壤硝化过程的主要驱动者^[10-11]。然而, 也有研究表明 AOA 主导了苏格兰典型农田土壤氨氧化过程^[12]。复杂自然环境下氨氧化古菌的生理代谢规律及其生态功能仍有待于进一步探索。

酸性环境中氨的离子化使得分子氨浓度极低, 因此低 pH 生态系统可能是研究 AOA 生态意义的理想模型。已知 AOB 最小的 K_s 值为 $1.92 \mu\text{mol/L}$ ^[2], 极低的氨分子无法支持土壤 AOB 的生长, 导致酸性土壤中 AOB 的衰减甚至消失^[13]。自 20 世纪 80 年代以来, 大量研究表明在典型的低 pH 森林土壤中, 除 AOB 之外的微生物可能主导了自养型硝化作用^[14]。事实上, 最近的研究表明, AOA 在酸性森林泥沼质土中表现出了很强的硝化活性, 但是 AOB 并没有被检测到^[15]。此外, 基因组分析表明海洋 AOA 具有异养或兼性生长的遗传基础^[16-17]。温室盆栽试验研究表明, 土壤 AOA 的生长可能利用水稻土根系分泌物作为碳源生长^[18]。森林生态系统通常有机碳含量高^[7], 它可以作为泉古菌或 AOA 异养生长的碳源。事实上, 许多研究表明异养而不是自养的硝化作用主导了森林土壤中的氮循

①基金项目: 国家自然科学基金项目 (40830531, 40921061) 和中国科学院知识创新重要方向项目 (KZCX2-YW-QN405) 资助。

* 通讯作者 (zccai@issas.ac.cn)

作者简介: 黄蓉 (1984—), 女, 江苏南京人, 硕士研究生, 主要从事土壤硝化微生物生态研究。 E-mail: rhuang@issas.ac.cn

环^[14,19-20],但是,AOA 或者泉古菌在低 pH 的森林土壤碳氮循环过程中的作用仍不很清楚。

酸性红壤在热带和亚热带区域分布广泛,占我国土地面积达 21%,并且它具有低 pH 和低硝化活性的特点。但是,目前酸性森林土壤中 AOA 对硝化过程贡献的研究较少。我们通过分析 5 种自然植被条件和 1 种人工种植条件下的酸性红壤中的 *amoA* 基因,研究氨氧化微生物丰度及其可能的影响因素。另外,我们还分析了细菌和泉古菌特有的 16S rRNA 基因的丰度。

1 材料方法

1.1 研究地概况

土样采自福建建瓯万木林自然保护区,位于福建省北部,东经 118°08′~118°09′,北纬 27°02′~27°03′。全区南北长 1.82 km,东西宽 1.04 km,土地总面积 1.89 km²。自然保护区为低山丘陵地带,海拔 234~556 m,地势由东南向西北倾斜,主脊南北走向,支脉向东西展开,东面和下部较陡,西面和中上部较为平缓,形如展开的扇子。气候属于中亚热带季风型气候,水、光、热资源丰富,年平均气温 18.7℃,年平均降雨量为 1 663.8 mm。土壤为花岗岩发育的红壤。万木林在 600 多年前原为一片人工林,在长期封禁保护下,经过了几个世纪的次生演替重新恢复为地带性亚热带常绿阔叶林,成为具有原始森林景观的自然体,它代表亚热带温暖湿润地区的常绿双子叶植物阔叶树林^[21-22]。采样选取了 6 种优势种群分别为细柄阿丁枫、

浙江桂、栲浮栲、观光木、杉木和桔园植被的土壤,其中杉木是上世纪 80 年代末种植的人工林,桔园已有 10 年树龄,年施氮肥量为 80 kg/hm²。

1.2 土壤样品采集

土壤采集时间为 2009 年 10 月,采样土壤植被为细柄阿丁枫 (*Altingia gralilipes*, ALG)、浙江桂 (*Cinnamomum chekiangense*, CIC)、栲浮栲 (*Castanopsis fargesii*, CAF)、观光木 (*Tsoongiodendron odorum*, TSO)、杉木 (*Cunninghamia lanceolata*, CUL) 和桔园 (*Orangerie*, ORG) 等几种典型植被。采样点 CIC、CAF 处于山阳,采样点 ALG 处于山阴,采样点 TSO 处于山阴与山阳交界,采样点 CUL、ORG 处于山脚。采用多点混合采样法采集表层 (0~15 cm) 土壤,每个植被土壤采 3 个重复样品,装入自封袋内,带回实验室,去除杂物、细根,过 2 mm 筛,4℃ 保存,测定自养硝化总速率和微生物性质;部分土样风干后测定土壤理化性质与养分元素含量^[23],所有土样的理化性质测定均在采样后两个月内完成。土壤 pH 值测定采用电位法;有机质测定采用重铬酸钾-氧化外热法;全氮测定采用开式法;全磷测定采用碱溶-钼锑抗比色法;全钾测定采用碱溶-原子吸收法;水解性氮测定采用碱解扩散法;有效磷测定采用氟化铵浸提-钼锑抗比色法;速效钾测定采用乙酸铵浸提-原子吸收法。自养硝化初级速率采用 ¹⁵N 稳定同位素成对标记和数值模型相结合的方法测定^[24]。福建万木林自然保护区土壤样品理化性质见表 1。

表 1 不同植被条件下土壤基本理化性质

Table 1 Basic properties of soil under different vegetations

植被	pH	有机碳 (g/kg)	全氮 (g/kg)	水解性氮 (mg/kg)	全磷 (g/kg)	有效磷 (mg/kg)	全钾 (g/kg)	速效钾 (mg/kg)	C/N	ONH ₄ (N μg/(g d))
ALG	4.12 bc	109 a	3.81 a	293 a	0.494 c	4.02 b	8.81 c	55.7 bc	28.7 a	0.194 de
CIC	4.08 bc	50.5 bc	2.74 b	233 bc	0.681 bc	2.89 bc	15.7 a	107 ab	18.4 ab	0.653 b
CAF	4.65 b	50.3 bc	1.77 c	209 c	0.623 bc	2.85 bc	14.1 a	132 a	28.8 a	0.119 e
TSO	4.00 c	57.3 b	2.99 b	255 ab	0.532 c	3.97 b	13.5 ab	37.7 c	19.0 ab	0.371 cd
CUL	4.60 bc	37.8 c	2.02 c	209 c	1.03 a	1.95 c	10.5 bc	157 a	18.6 ab	0.501 bc
ORG	5.51 a	15.2 d	1.36 d	124 d	0.947 ab	18.2 a	16.1a	64.3 bc	11.2 b	1.98 a

注:表中各含量土重均以干土计;同一列中不同字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著;ONH₄ 表示转化为 NO₃⁻ 的氧化速率。

1.3 土壤微生物基因组 DNA 提取和实时荧光定量 PCR 分析

采用 FastDNA® SPIN Kit For Soil (MP Biomedicals, LLC) 试剂盒和 FastPrep® 24 bead-beating instrument (Qbiogene, Inc.) 细胞裂解仪提取土壤总

DNA。称取 0.5 g 土壤样品,按试剂盒操作说明的实验步骤进行土壤微生物总 DNA 的提取,DNA 样品保存于 -20℃ 待用。细菌、泉古菌、氨氧化细菌和氨氧化古菌定量 PCR 分析的分子靶基因及反应程序如表 2 所示。

表2 荧光实时定量 PCR 扩增引物及反应条件

Table 2 Primers and PCR conditions used in study

基因名称	引物序列 (5'-3')	片段长度	定量 PCR 反应程序
细菌 16S rRNA 基因	515F GTG CCA GCM GCC GCG G	382 bp	95℃, 30 s; 35 × (95℃, 5 s; 55℃, 30 s; 72℃, 30 s 读板); 融解曲线 65.0~95.0℃, 增加 0.5℃, 0:05+读板
	907R CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT		
泉古菌 16S rRNA 基因	771F ACG GTG AGG GAT GAA AGCT	163 bp	95℃, 3.0 min; 35 × (95℃, 30 s; 55℃, 30 s; 72℃, 30 s 读板); 融解曲线 65.0~95.0℃, 增加 0.5℃, 0:05+读板
	934R GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT		
氨氧化细菌 <i>amoA</i> 基因	amoA-1F GGGGTTTCTACTGGTGGT	491 bp	95℃, 5.0 min; 35 × (95℃, 30 s; 57℃, 45 s; 72℃, 1 min; 85℃, 5 s 读板); 融解曲线 65.0~95.0℃, 增加 0.5℃, 0:05+读板
	amoA-2R CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
氨氧化古菌 <i>amoA</i> 基因	Arch-amoAF TAATGGTCTGGCTTAGACG	635 bp	95℃, 3.0 min; 35 × (95℃, 30 s; 55℃, 30 s; 72℃, 30 s 读板); 融解曲线 65.0~95.0℃, 增加 0.5℃, 0:05+读板
	Arch-amoAR CGGCCATCCATCTGTATGT		

参照 He 等^[25]报道的方法, 可得到细菌、泉古菌、氨氧化细菌和氨氧化古菌分子靶基因的重组质粒, 根据已知质粒浓度和阿伏伽德罗常数 (6.02×10^{23} 分子数/mol) 分别计算各自基因拷贝数, 其中细菌为 1.48×10^{10} 拷贝数/ μl , 泉古菌为 1.30×10^{10} 拷贝数/ μl , 氨氧化细菌为 1.34×10^{10} 拷贝数/ μl , 氨氧化古菌为 1.32×10^{10} 拷贝数/ μl 。分别以 10 倍梯度稀释各基因重组质粒, 通过实时荧光定量 PCR 获得细菌、泉古菌、氨氧化细菌及氨氧化古菌的标准曲线, 每个样品 3 次重复。

采用大连宝生物工程有限公司的 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Perfect Real Time 试剂盒于 CFX96 Real-Time PCR System 扩增仪上分析。定量 PCR 的反应体系为 20 μl , 包括 1 μl DNA 模板、10 μl SYBR Premix Ex Taq[™] Perfect Real Time, 前、后引物各 0.4 μl (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 8.2 μl 的灭菌双蒸水。实验对照用灭菌双蒸水代替 DNA 作为反应模板。

1.4 统计分析

文中结果均以烘干土 (105℃, 24 h) 来表达, 利用 SPSS17.0 软件, 对细柄阿丁枫、浙江桂、桫欏、观光木、杉木和桔园 6 种植被土壤样品 (各 3 个重复), 进行了相关统计分析。

2 结果与分析

2.1 土壤基本性质

各种植被土壤样品基本性质差异较大 (表 1)。自然植被土壤酸性较强, pH 在 4.00~4.65 之间; 桔园土壤的 pH 略高于森林土壤但仍呈酸性。土壤有机碳含量在阿丁枫植被条件下比其他植被条件高出 1 倍左右, 而桔园植被条件下显著低于其他植被条件 ($P < 0.05$)。由于土壤有机质含量低, 桔园土壤全氮和水解性氮含

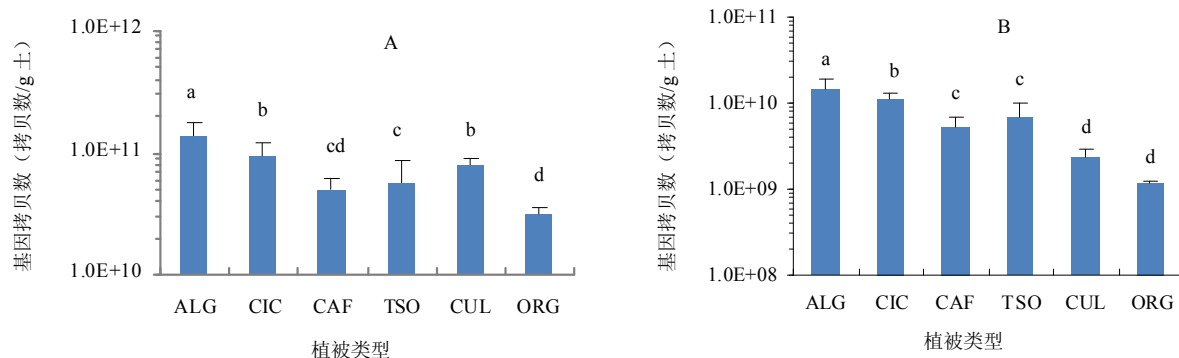
量明显低于其他植被自然条件下的土壤 ($P < 0.05$)。较高的 pH 和施肥使桔园土壤铵态氮硝化速率大幅度提高, 是其他自然植被土壤的 3~10 倍。

2.2 土壤细菌、泉古菌、氨氧化细菌、氨氧化古菌丰度

通过实时荧光定量 PCR 获得的细菌、泉古菌、氨氧化细菌及氨氧化古菌标准曲线的 R^2 为 0.994~0.999, 扩增效率为 91.9%~105.9%, 曲线斜率在 -3.189~-3.532 之间。实验数据均在标线线性范围内。

浙江桂、桫欏、细柄阿丁枫、观光木和杉木 5 种自然植被条件下土壤细菌 (图 1A) 和泉古菌 (图 1B) 基于 16S rRNA 基因测定的丰度均高于桔园植被土壤。细柄阿丁枫土壤细菌和古菌数量均最大, 基因拷贝数分别达到每克干土 1.39×10^{11} 和 1.46×10^{10} 。细柄阿丁枫植被条件下土壤有机碳和全氮均最高 (表 1), 可能为微生物的生长提供了丰富的碳源和氮源。桔园土壤的细菌和泉古菌数量最低, 可能是施肥等人为因素改变了自然状态下微生物群落结构的结果。

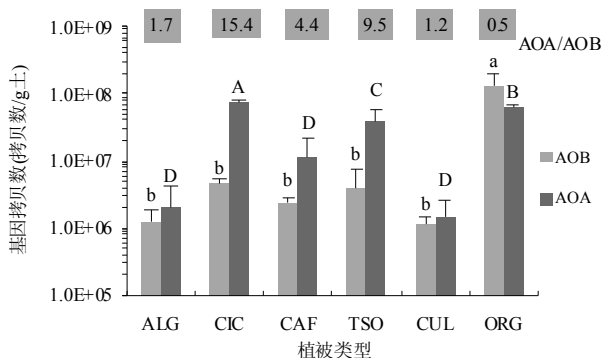
AOA/AOB 是研究自养硝化微生物相对贡献率的一个重要指标。本研究所采集的土壤样品中, 氨氧化细菌 (AOB) 的数量在自然植被下较为一致, 而氨氧化古菌 (AOA) 的数量变异较大。5 种自然植被条件下土壤 AOA 的数量均高于 AOB (图 2), AOA/AOB 比率从 1.2 到 15.4。桔园土壤中 AOA 数量没有明显改变, 而 AOB 数量显著增高, 超过 AOA, 导致桔园土壤中 AOA/AOB 比率仅为 0.5。此外, 5 种自然植被条件下氨氧化古菌的 *amoA* 基因拷贝数占泉古菌 16S rRNA 基因的比例为 0.01%~0.64%, 桔园土壤的比例大幅上升到 5.32%。上述结果显示, AOB 对施肥的响应非常明显, 而 AOA 生理生长的影响因子可能更为复杂。



(图中误差线表示标准误差, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同)

图 1 不同植被条件下土壤细菌 (A) 和泉古菌 (B) 丰度

Fig. 1 Abundances of soil bacteria (A) and crenarchaeota (B) under different vegetations



(图中灰色方框中数字表示各植被土壤 AOA/AOB 比率。图中误差线表示标准误差, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 其中小写字母表示 AOB 的统计结果, 大写字母表示 AOA 的统计结果)

图 2 不同植被条件下土壤氨氧化细菌和氨氧化古菌丰度及比率

Fig. 2 Soil AOA and AOB abundances and AOA/AOB ratios under different vegetations

2.3 相关性分析

土壤微生物丰度与土壤各项理化性质相关性均不

强 (表 3), 仅土壤 AOB 丰度与土壤有效态磷表现出显著正相关 ($r = 0.650$, $P < 0.01$)。土壤初级硝化速率与土壤 AOB 丰度呈现出显著正相关关系 ($r = 0.714$, $P < 0.01$), 而与其他各项微生物丰度相关性不明显。

3 讨论

长期封禁保护下的自然植被土壤 $pH < 5$ 。此外, 福建地区氮沉降很少^[26], 在无人干扰的自然状态下, 硝化能力受到土壤自身氨浓度的限制, AOB 数量偏低。已有的研究表明, 即使在强烈酸化条件下, 土壤仍可保持一定的 AOB 丰度^[27]。改成桔园后, 土壤 pH (5.51) 显著提高, 且每年施用氮肥, 明显促进了 AOB 的生长, 其丰度比自然条件下提高了 2 个数量级, 达到每克干土 1.32×10^8 个拷贝数。农田土壤 AOB 的很多研究都表明, 土壤 AOB 对施肥作用, 特别是氮肥有很好的响应。以中国科学院红壤生态试验站发育于第四纪红黏土的植稻红壤为对象的研究推测: 尿素可提高土壤水解氮含量, 使土壤脲酶活性提高, 促进硝化

表 3 土壤微生物丰度与土壤性质的相关分析

Table 3 Correlations between soil microbial abundances and soil properties

	pH	有机碳	全氮	全钾	全磷	有效磷	水解性氮	速效钾	C/N	ONH ₄
AOA	-0.253	-0.076	0.071	0.321	-0.044	-0.190	0.033	0.051	-0.121	0.028
AOB	0.352	-0.446	-0.267	0.528*	0.195	0.650**	-0.366	-0.213	-0.465	0.714**
细菌	0.093	0.355	0.274	-0.320	-0.148	0.259	0.101	-0.322	0.051	0.076
泉古菌	0.228	0.355	0.274	-0.187	-0.192	0.442	0.067	-0.489*	0.055	0.205
AOB/AOA	-0.081	-0.247	-0.238	0.113	-0.051	-0.367	-0.226	0.163	-0.134	-0.167
AOB/细菌	-0.278	-0.063	0.097	0.318	-0.042	-0.208	0.058	0.072	-0.117	0.017
AOA/泉古菌	-0.252	-0.087	0.102	0.349	0.008	-0.123	0.067	0.107	-0.137	0.085

注: * 表示在 $P < 0.05$ 水平显著相关, ** 表示在 $P < 0.01$ 水平显著相关, $n = 18$ 。

细菌的生长, 进而提高土壤硝化率和硝化势^[28]。但是, 本研究表明, 施肥和提高土壤 pH 没有改变 AOA 数量, 而且桔园土壤的细菌和泉古菌总量均有不同程度的下降 (图 1)。

AOA 和 AOB 对土壤自养硝化过程的相对贡献率是目前氮循环研究关键的微生物生态学问题之一^[29]。20 世纪 90 年代后, 分子生态学研究发现泉古菌广泛分布于地球各种环境, 改变了人们传统上认为古菌仅存于极端环境的观念。此外, 泉古菌具有较高的丰度, 占海洋微生物总量高达 39%^[30], 占土壤微生物总量最高可达 12%^[31]。但是泉古菌在土壤环境中的分布以及生态功能目前并没有得到一致的结论^[11-12,32-33]。利用 ¹⁵N-pool 富集技术对江西鹰潭地区酸性森林土壤自养硝化作用的研究表明, 在远低于 AOB 生长所需的氨临界值的土壤中, 硝化活性的变化和氨氧化古菌 *amoA* 基因数量和组成的变化能够很好地耦合, 而氨氧化细菌几乎检测不到 (未发表数据)。在本项研究中, 采用 ¹⁵N 稳定同位素成对标记和数值模型相结合的方法测定初级硝化速率的结果表明, 桔园土壤初级硝化速率远高于自然植被土壤, 最高达 16.6 倍 (观光木), 最低为 3.03 (杉木) 倍。从土壤初级硝化速率与 AOB 呈显著的正相关 ($r=0.714$, $P<0.01$), 而与 AOA 无显著相关性 ($r=0.028$, $P>0.05$, 表 3) 推断, 参与土壤硝化作用的氨氧化微生物类群似乎是 AOB 而不是 AOA。

此外, 本研究中 5 种自然植被条件下氨氧化古菌的 *amoA* 基因拷贝数占泉古菌 16S rRNA 基因的比例都小于 1% (0.01%~0.64%), 桔园土壤中比例大幅上升到 5.32%, 同时, 氨氧化细菌的数量也有显著增加, 根据这些结果推测, 施用氮肥也可能促进了氨氧化古菌的相对生长, 而且土壤中相当比例的泉古菌不含 *amoA* 基因, 可能不具有氨氧化能力, 与最近的海洋古菌研究结果吻合^[34]。此外, 氨氧化细菌和古菌对土壤环境改变的响应机理可能存在很大的差异, 与土壤自身性质、氨氧化反应的底物浓度、温度、水分、外界刺激 (氮输入) 等因素有密切关系。仅仅从 AOB/AOA 的比例或是 *amoA* 基因丰度上来研究两者对自养硝化作用的相对贡献有一定的局限性, 采用稳定同位素核磁共振技术有望揭示氨氧化古菌生理代谢特征及其生态功能, 可能是进一步研究的重点。

4 结论

对福建万木林自然植被条件下和农业利用方式下

土壤自养硝化作用的研究显示, 长期封禁保护下的自然植被土壤 pH<5, 土壤 AOB 数量偏低, 人为施肥大大促进了 AOB 的生长, 其丰度比自然条件下提高了 2 个数量级。采用 ¹⁵N 稳定同位素成对标记和数值模型相结合的方法测定的土壤初级硝化速率与 AOB 数量呈显著的相关性 ($r=0.714$, $P<0.01$), 而与 AOA 无显著相关性, 推测 AOB 是硝化作用的主要驱动者。但是, 这种变化没有在 AOA 的数量上表现出来, 仅仅在古菌 *amoA* 基因/泉古菌 16S rRNA 基因的比例上有显著增加, 表明并非所有泉古菌都具备氨氧化功能基因 *amoA*, 氮肥施用也可能在一定程度上促进了氨氧化古菌的生长。

参考文献:

- [1] Gruber N, Galloway JN. An earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 2008, 451: 293-296
- [2] Koops HP, Pommerening-Röser A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 37: 1-9
- [3] Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437: 543-546
- [4] Erguder TH, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33: 855-869
- [5] Leininger S, Urich T, Schlöter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442: 806-809
- [6] Suzuki I, Dular U, Kwok SC. Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *The Journal of Bacteriology*, 1974, 120: 556-558
- [7] Babic KH, Schauss K, Hai B, Sikora S, Eepovi S, Radl V, Schlöter M. Influence of different *Sinorhizobium meliloti* inocula on abundance of genes involved in nitrogen transformations in the rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 2 922-2 930
- [8] Park BJ, Park SJ, Yoon DN, Schouten S, Sinninghe Damste JS, Rhee SK. Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in co-culture with sulfur-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76: 7 575-7 587
- [9] Schleper C. Ammonia oxidation: different niches for bacteria and

- archaea? International Society for Microbial Ecology, 2010, 4: 1 092–1 094
- [10] Jia ZJ, Conrad R. Bacteria rather than archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1 658–1 671
- [11] Zhang LM, Offre PR, He JZ, Verhamme DT, Graeme WN, Prosser JI. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107: 17 240–17 245
- [12] Xia WW, Zhang CX, Zeng XW, Feng YZ, Weng JH, Lin XG, Zhu JG, Xiong ZQ, Xu J, Cai ZC, Jia ZJ. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. *International Society for Microbial Ecology*, 2011, doi:10.1038
- [13] De Boer W, Kowalchuk GA. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33: 853–866
- [14] Jordan FL, Cantera JJL, Fenn ME, Stein LY. Autotrophic ammonia-oxidizing bacteria contribute minimally to nitrification in a nitrogen-impacted forested ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 197–206
- [15] Stopnisek N, Gubry-Rangin C, Hofferle S, Nicol GW, Mandic-Mulec I, Prosser JI. Thaumarchaeal ammonia oxidation in an acidic forest peat soil is not influenced by ammonium amendment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76: 7 626–7 634
- [16] Hallam SJ, Mincer TJ, Schleper C, Preston CM, Roberts K, Richardson PM, DeLong EF. Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine crenarchaeota. *PLoS Biology*, 2006, 4: e95
- [17] Walker CB, de la Torre JR, Klotz MG, Urakawa H, Pinel N, Arp DJ, Brochier-Armanet C, Chain PSG, Chan PP, Gollabgir A, Hemp J, Hüglerl M, Karr EA, Könneke M, Shin M, Lawton TJ, Lowe T, Martens-Habben W, Sayavedra-Soto LA, Lang D, Sievert SM, Rosenzweig AC, Manning G, Stahl DA. Nitrosopumilus maritimus genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107: 8 818–8 823
- [18] Chen XP, Zhu YG, Xia Y, Shen JP, He JZ. Ammonia-oxidizing archaea: Important players in paddy rhizosphere soil? *Environmental Microbiology*, 2008, 10: 1 978–1 987
- [19] Pedersen H, Dunkin KA, Firestone MK. The relative importance of autotrophic and heterotrophic nitrification in a conifer forest soil as measured by ^{15}N tracer and pool dilution techniques. *Biogeochemistry*, 1999, 44:135–150
- [20] Schimel JP, Firestone MK, Killham KS. Identification of heterotrophic nitrification in a sierran forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 48: 802–806
- [21] 闫淑君, 封磊, 王新功, 毕晓丽, 洪伟, 吴承祯. 万木林自然保护区不同群落优势种高度结构研究. *应用生态学报*, 2003, 14(12): 2 355–2 358
- [22] 郭剑芬, 陈光水, 钱伟, 杨少红, 杨玉盛, 郑群瑞. 万木林自然保护区2种天然林及杉木人工林凋落量及养分归还. *生态学报*, 2006, 26(12): 4 091–4 098
- [23] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000
- [24] Müller C, Rütting T, Kattge J, Laughlin RJ, Stevens RJ. Estimation of parameters in complex ^{15}N tracing models via Monte Carlo sampling. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39: 715–726
- [25] He JZ, Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, Zheng YM, Xu MG, Di HJ. 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. *Environmental Microbiology*, 2007, 9: 2 364–2 374
- [26] 黄玉梓, 樊后保, 李燕燕, 高春芬, 刘文飞. 氮沉降对杉木人工林生长及林下植被碳库的影响. *生态环境学报*, 2009, 18(4): 1 407–1 412
- [27] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展. *生态学报*, 2009, 29(1): 406–415
- [28] 钟文辉, 蔡祖聪, 尹力初, 张鹤. 种植水稻和长期施用无机肥对红壤氨氧化细菌多样性和硝化作用的影响. *土壤学报*, 2008, 45(1): 105–111
- [29] 贾仲君, 翁佳华, 林先贵, Conrad R. 氨氧化古菌的生态学研究进展. *微生物学报*, 2010, 50(4): 431–437
- [30] Karner MB, DeLong EF, Karl DM. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, 2001, 409: 507–510
- [31] 刘骅, 林英华, 张云舒, 谭新霞, 王西和. 长期施肥对灰漠土生物群落和酶活性的影响. *生态学报*, 2008, 28(8): 3 898–3 904
- [32] Jia ZJ, Conrad R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11: 1 658–1 671
- [33] Pratscher J, Dumont MG, Conrad R. Ammonia oxidation coupled to CO_2 fixation by archaea and bacteria in an agricultural soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108: 4 170–4 175

- [34] Agogue H, Brink M, Dinasquet J, Herndl GJ. Major gradients in Atlantic. *Nature*, 2008, 456: 788–791
putatively nitrifying and non-nitrifying Archaea in the deep North

Abundances of Ammonia-oxidizing Prokaryotes and Gross Nitrification Activities in Forest Soils Under Different Vegetations in a Natural Reserve

HUANG Rong^{1,2}, ZHANG Jin-bo¹, ZHONG Wen-hui³, JIA Zhong-jun¹, CAI Zu-cong¹

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China;

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3 College of Chemistry and Environmental Science,

Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: In this study, the relative contribution of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and archaea (AOA) to nitrification were investigated in acidic forested soils derived from granite in Wanmulin nature reserve, Jianou, Fujian Province of southern China. The abundances of AOA and AOB communities were determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR), while gross nitrification activity was measured using ¹⁵N-pool enrichment technique in soils under five different vegetations over 600 years plantation one orange cultivation system. The results showed that soil pH, the abundance of AOB and gross nitrification rate were significantly lower in natural vegetation soil than those soil cultivated with orange plant. Furthermore, a significant correlation between the population size of soil AOB and soil gross nitrification activity suggested that AOB might dominate autotrophic nitrification in forested soil typical of the low-pH ecosystems, particularly in orange soil. The copy number ratio of archaeal *amoA* to crenarchaeota-specific 16S rRNA genes varied from 0.01% - 0.64% in all five natural vegetation soils while up to 5.32% in orange soil. The results indicated that not all archaea possessed ammonia-oxidizing functional gene of *amoA* and fertilization may facilitate AOA growth in soils cultivated with orange as well.

Key words: Acidic red soil, Microbial abundance, Real-time quantitative PCR, ¹⁵N stable isotope labeling