

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2021.01.003

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. 土壤, 2021, 53(1): 13–20.

亚硝化球菌属(*Nitrososphaera*)可能是酸性土壤硝化作用的重要驱动者^①

李文兴^{1,2}, 郑曼曼^{1,2}, 王超^{1*}, 沈仁芳^{1,2}

(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 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 选择初始 pH 相近的两个酸性土壤 (JX-3 和 JX-7) 样品进行培养试验, 探讨了氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)和氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)在酸性土壤硝化过程中所发挥的作用。结果显示, 经过 50 d 的培养, JX-7 样品硝化速率显著高于 JX-3, 且明显降低土壤 pH。培养后, 两个土壤样品 AOB 丰度均增加, 但样品间没有显著差异; JX-7 土壤 AOA 丰度显著增加, 而 JX-3 无显著变化。两个土壤样品 AOA 群落组成本身存在分异, 但对于同一样品培养前后均无显著分异; AOB 群落组成在两土壤间没有分异, 但培养前后分别有分异。培养后, JX-7 样品中 AOA 优势属 *Nitrososphaera* 和某些未知微生物的个别 OTUs 绝对丰度显著增加, 而两样品 AOB 中 *Nitrosospira* 属的一些 OTUs 的绝对丰度均显著增加。因此, 所研究的酸性土壤样品中 AOA 是硝化作用的主要贡献者, 而且 AOA 主要通过提高 *Nitrososphaera* 属中个别 OTUs 的丰度, 而不是整个群落来调控硝化作用。

关键词: *Nitrososphaera*; 氨氧化古菌; 绝对丰度; 硝化速率; 酸性土壤

中图分类号: S154.3 **文献标志码:** A

Nitrososphaera May Be A Major Driver of Nitrification in Acidic Soils

LI Wenxing^{1,2}, ZHENG Manman^{1,2}, WANG Chao^{1*}, SHEN Renfang^{1,2}

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In this study, samples of two acidic soils (JX-3 and JX-7) with similar initial pH were selected for incubation experiments to study the roles of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in the nitrification of acidic soils. The results showed that after 50 d incubation, the nitrification rate of JX-7 sample was significantly higher than that of JX-3, and soil pH was significantly reduced. After incubation, AOB abundances of two soil samples increased, but there was no significant difference between two soil samples; AOA abundance of JX-7 significantly increased, while JX-3 changed insignificantly. AOA community structures of two soil samples were different, but there was no significant difference between incubation time; AOB community structures of two soil samples had the similar community structure, but they were different between incubation time. After incubation, the absolute abundances of dominant AOA (e.g., *Nitrososphaera* and some unknown microbes) in JX-7 sample significantly increased; the absolute abundances of some AOB such as *Nitrosospira* in both two samples significantly increased. Therefore, AOA played an important role in nitrification of acidic soil studied; and AOA mainly regulated nitrification by increasing the abundances of individual OTUs such as *Nitrososphaera* rather than the entire community.

Key words: *Nitrososphaera*; Ammonia-oxidizing archaea; Absolute abundance; Nitrification rate; Acidic soils

我国酸性土壤 (pH<5.5) 面积为 217.96 万 km², 占全国土地面积的 22.7%, 主要分布在南方热带和亚热带地区, 具有丰富的光、热、水、土和生物资源^[1]。近年来, 由于氨态氮肥过量施用和工业化导致的酸沉降等人为活动强度的不断增加, 土壤酸化程度在加

剧, 酸化面积在不断扩大^[2], 严重限制了土壤的生产潜力, 并对生态环境造成严重危害。

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分, 主导的硝化作用不仅是元素生物地球化学循环的重要组成部分^[3-5], 也是土壤酸化的重要驱动者^[2], 因此

①基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC0407604, 2016YFD0200302)和国家自然科学基金项目(51779077, 91747104)资助。

* 通讯作者(chwang@issas.ac.cn)

作者简介: 李文兴 (1993—), 女, 山西大同人, 硕士研究生, 主要从事土壤氮循环微生物研究。E-mail: liwenxing@issas.ac.cn

越来越受到研究人员的重视。经典硝化作用分为两步,第一步是氨氧化过程,即将氨(NH_3)氧化为亚硝酸根(NO_2^-);第二步是亚硝酸盐氧化过程,即将 NO_2^- 氧化为硝酸根 NO_3^- ;其中氨氧化过程是硝化作用的限速步骤,在氮循环中扮演着重要角色^[6]。上百年来,氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)一直被认为是土壤氨氧化过程的主要驱动者^[7]。但是,2005 年 Könneke 等人^[8]在海洋中分离出一株可以进行氨氧化过程的泉古菌,其属于化能无机自养代谢氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)。进一步研究证实, AOB 和 AOA 都参与氨氧化过程,其贡献能力取决于特定的环境和微生物类群组成^[9-10]。例如, AOA 和 AOB 对土壤 pH 和底物 NH_3 的敏感性不同^[11]。Wang 等^[12]研究发现,由于 AOA 和 AOB 在 4 种环境(稻田、河口、浅滩和湿地)中群落组成明显不同,它们的氨氧化活性差异较大。基于目前对土壤酸化的高度重视,研究认为 AOA,尤其是奇古菌和泉古菌,是酸性土壤氨氧化过程主要驱动者,原因在于其能够较好地适应酸性土壤的环境特点,特别是较低土壤 pH^[11]。然而,一些研究发现,酸性土壤中 AOB 的某些种属类群(如 *Neutrophilic bacteria* 和 *Nitrosospora cluster 8a* 等)也可能发挥重要作用^[13-14]。即使在相似的土壤 pH 下,一些特定的 AOA 或 AOB 类群也表现

较大差异的功能。例如, AOA 中 Group 1.1a 的古菌微生物类群在酸性水稻土壤(pH = 4.8)和森林土壤(pH = 4.2)氨氧化过程中发挥重要的作用,而 AOB 中 *Nitrosospora cluster 3-like* 的微生物类群主要参与酸性旱作土壤(pH = 4.7)中的氨氧化过程^[15]。可见,由于受多种因素的影响, AOB 和 AOA 对酸性土壤氨氧化过程的相对贡献仍存在较大争议,发挥作用机理需要进一步阐明。

早期研究认为酸性土壤硝化作用很弱,但是目前很多证据证明了在某些特定的酸性土壤中,其硝化作用也很强烈。基于本实验室前期对我国南方酸性红壤区采集的 51 个土壤样品^[16],发现样品间硝化作用潜能存在较大差异,本研究选择其中两个 pH 相近且硝化能力差异较大的土壤样品,期望通过测定氨氧化微生物的丰度和群落组成,分析 AOA 和 AOB 在酸性土壤硝化过程中所扮演的角色,并探索发挥作用的机制。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

培养试验所用酸性土壤样品分别采自江西鹰潭柑桔园和旱地农田,根据我们前期研究,依次命名为 JX-3 和 JX-7^[16]。两个土壤样品起始基本理化性质见表 1。

表 1 供试土壤基本理化性质
Table 1 Physicochemical properties of tested soil

土样	pH	硝态氮(mg/kg)	铵态氮(mg/kg)	有效磷(mg/kg)	速效钾(mg/kg)	全碳(g/kg)	全氮(g/kg)	全磷(g/kg)	全钾(g/kg)
JX-3	4.49	0.10	3.35	49.47	101.44	8.86	0.91	0.50	1.97
JX-7	4.33	0.75	3.15	36.80	237.59	9.53	1.03	0.47	2.28

1.2 土壤硝化作用测定

称取 50 g 过 2 mm 筛的风干土放于 250 ml 培养瓶中,加去离子水至最大持水量的 40%,用塑料膜将培养瓶封口。于 28 °C 环境中恒温黑暗预培养 7 d 后,按照 N 250 mg/kg 干土加入硫酸铵,最后将土壤水分含量调至最大持水量的 60%,用塑料膜将培养瓶封口,于 28 °C 环境中恒温黑暗培养。培养期间每隔 1 d 采用称重法补水 1 次,使土壤水分保持基本不变。培养开始后的 0 d 和 50 d 分别取样。

土壤 pH 采用风干土测定,用 pH 计(Mettler Toledo FE20, 上海, 中国)在土水比为 1 : 2.5 的条件下测定;土壤铵态氮和硝态氮采用鲜土测定,2 mol/L 氯化钾浸提后,用流动分析仪(San⁺⁺, Skalar, Holland)测定。

1.3 土壤 DNA 提取和基因丰度测定

称取 0.50 g 新鲜土壤样品,采用 Fast[®]DNA SPIN

Kit (MP Biomedicals, CA, USA)提取土壤 DNA,并采用 PowerClean[®]DNA Clean-up Kit (MoBio, CA, USA)纯化土壤 DNA,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。每个土壤样品连续提取两次 DNA,将其混合在一起作为一个土壤样品 DNA。

在 LightCycler 480 Real-Time 定量 PCR 仪(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)上进行实时荧光定量 PCR,测定与氨氧化过程相关基因(古菌 *amoA* 和细菌 *amoA*)的丰度。氨氧化微生物功能基因古菌 *amoA* 和细菌 *amoA* 扩增引物分别为 Arch-*amoA*-F (5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3')/Arch-*amoA*-R (5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3')^[8]和 Bac-*amoA*-F (5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3') / Bac-*amoA*-R (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3')^[17]。定量 PCR 反应体系为 10 μl ,包括 5 μl TB Green[™]Premix Ex

Taq™ (2x), 上下引物各 0.4 μ l, 2 μ l DNA 模板(稀释 20 倍), 2.2 μ l 超纯无菌水。定量 PCR 反应条件如下: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。每个土壤 DNA 样品扩增 3 次。对含有目的基因的质粒进行 10 倍梯度稀释, 于同一条件下进行 qPCR, 得到标准曲线。古菌 *amoA* 和细菌 *amoA* 的 qPCR 扩增效率分别为 94.0%($R^2 = 0.999$)和 102.5%($R^2 = 0.991$)。

1.4 AOA 和 AOB 中 *amoA* 基因高通量测序

以提取的土壤 DNA 为模板, 采用 Arch-*amoA*-F/R 和 Bac-*amoA*-F/R 引物对目的片段进行 PCR 扩增。获得 PCR 产物后, 对其进行纯化、建立文库和文库质检, 最后利用 454 GS FLX+ 仪器进行测序。所有原始下机数据首先运用 QIIME 软件识别疑问序列并去除^[18]; 随后通过 QIIME 软件调用 USEARCH 检查并剔除嵌合体序列。剩余的高质量序列利用 UCLUST 序列比对工具按照 97% 的相似度划分操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU), 每个 OTU 中数量最多的序列被选为该 OTU 的代表序列^[19]。最后将所有代表序列与 NCBI GenBank 中具有分类信息的序列相比对, 获得每个 OTU 所对应的分类学信息。

1.5 数据处理与统计分析

土壤 pH 变化量是培养开始后 50 d 的土壤 pH 减去 0 d 的 pH。土壤硝化速率是单位时间内土壤硝态氮含量的增加量, 即培养开始后 50 d 的土壤硝态氮含量与 0 d 土壤硝态氮含量的差值除以 50 d^[20]。

AOA 和 AOB 前 20 位 OTUs 的绝对丰度是高通

量测序数据中相对丰度前 20 位 OTUs 的相对丰度乘以对应基因的总丰度。

数据处理采用 Microsoft Excel 2019, 并采用 SPSS 22.0 进行统计分析。采用单因素方差分析检验 AOA 和 AOB 中 *amoA* 基因丰度的差异显著性。多重比较采用邓肯(Duncan)法, 差异显著性水平为 0.05。采用独立样本 *t*-检验分析供试土壤之间土壤 pH 变化量、硝化速率, 同一供试土壤下培养开始后 0 d 和 50 d 之间微生物前 20 位 OTUs 绝对丰度差异显著性。应用 R 语言 vegan 包对微生物群落结构进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。作图使用 Origin 2019 软件。

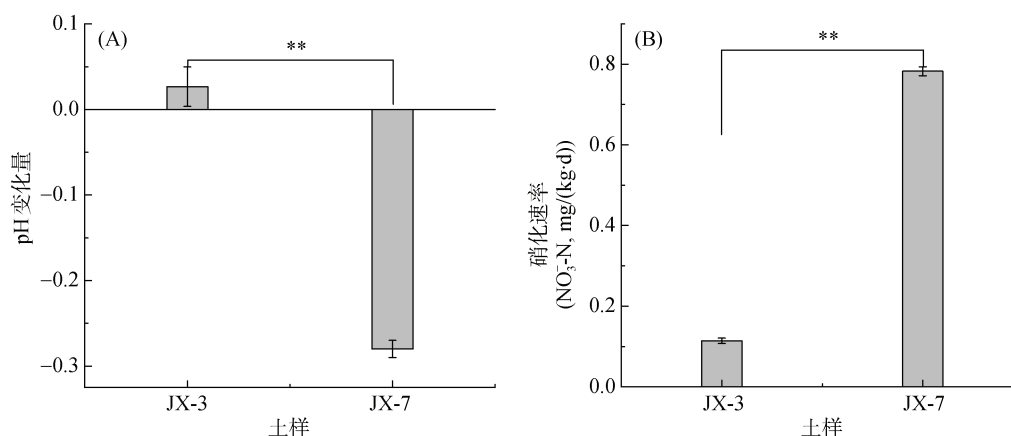
2 结果

2.1 土壤 pH 变化量和硝化速率

培养 50 d 后, JX-3 土壤 pH 基本稳定不变, 而 JX-7 土壤 pH 显著下降(图 1A)。两个土壤硝化速率存在显著差异, 即 JX-7 (0.78 mg/(kg·d)) > JX-3 (0.11 mg/(kg·d)) (图 1B)。可见, 土壤硝化作用越强, 土壤酸化越明显, 但不同土壤间存在较大差异。

2.2 土壤 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因丰度

两个土壤本身 AOB 的 *amoA* 基因丰度存在显著差异, 但 AOA 并没有显著差异(图 2)。培养 50 d 后, JX-7 土壤 AOA 的 *amoA* 基因丰度显著增加(图 2A), 但是 JX-3 无显著增加。两个土壤 AOB 的 *amoA* 基因丰度也均显著增加, 但样品间无明显差异(图 2B)。可以推测, AOA 可能是硝化作用的主要驱动者。



(** 表示土壤 pH 变化量或硝化速率在不同供试土壤间差异达 $P < 0.01$ 显著水平)

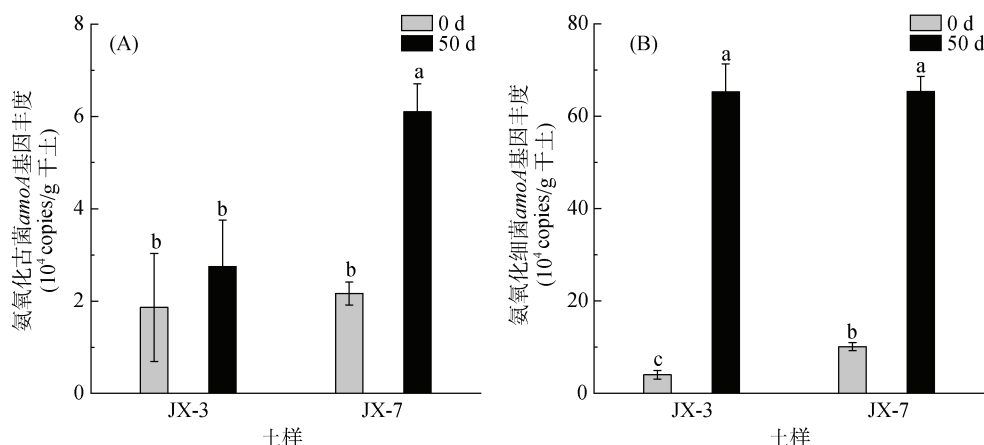
图 1 培养 50 d 后土壤 pH 变化量(A)和硝化速率(B)

Fig. 1 Soil pH changes (A) and nitrification rates (B) after 50 d incubation

2.3 土壤 AOA 和 AOB 群落分析

土壤氨氧化微生物群落组成分析结果(图 3)显示, 酸性土壤 AOA 群落主要的菌属是 *Nitrososphaera*

和 *Candidatus Nitrosocosmicus*; AOB 群落主要的菌属是 *Nitrosospira*、*Nitrosovibrio*、*Nitrosomonas* 和 *Sphingopyxis*。这些菌属相对丰度的占比在样品间存在差异。



(图中小写字母不同表示土壤 AOA 或 AOB 的 *amoA* 基因丰度在不同土壤间差异达显著水平 ($P < 0.05$))

图 2 土壤 AOA (A) 和 AOB (B) 的 *amoA* 基因丰度

Fig. 2 Soil archaeal *amoA* (A) and bacterial *amoA* (B) genes abundances

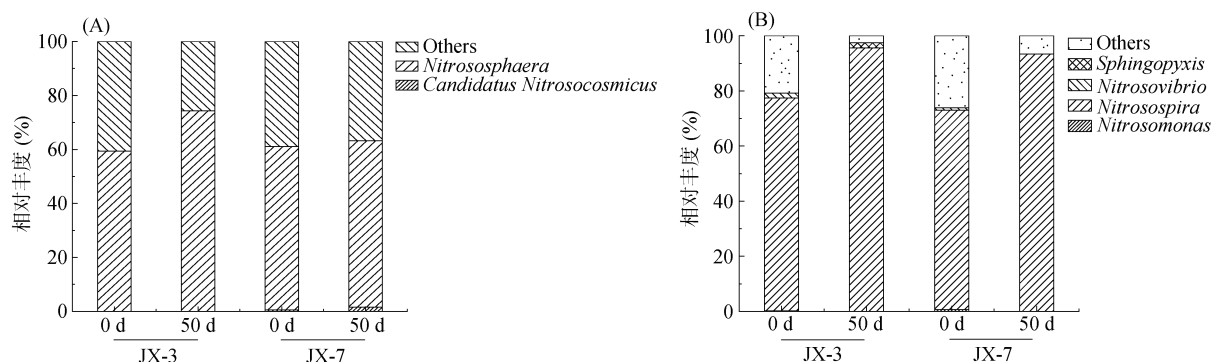


图 3 土壤 AOA (A) 和 AOB (B) 微生物群落组成

Fig. 3 Soil AOA (A) and AOB (B) microbial community compositions

土壤 AOA 群落结构分析结果(图 4A)显示,主成分 1 和主成分 2 分别解释变量方差的 49.83% 和 29.09%; JX-7 和 JX-3 在主成分轴 1 上有很好的分异,但是这两个土壤中 AOA 群落在培养前后(0 d 和 50 d)没有显著分异。土壤 AOB 群落结构分析结果(图 4B)显示,主成分 1 和主成分 2 分别解释变量方差的 89.55% 和 9.13%;AOB

群落在 JX-3 和 JX-7 间没有分异,但这两个土壤 AOB 群落在培养前后(0 d 和 50 d)表现出很好的分异。

2.4 优势 OTUs 的绝对丰度

土壤 AOA 绝对丰度前 20 位 OTUs 分析结果(表 2)显示, JX-7 中 otu1138 和 otu563 绝对丰度在培养后显著增加,而 JX-3 中没有显著变化的

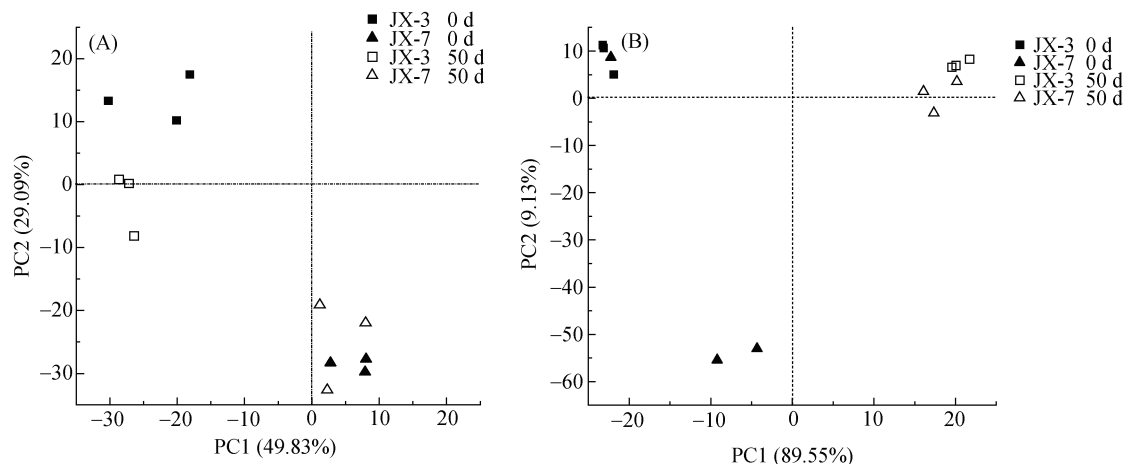


图 4 土壤 AOA(A)和 AOB (B)微生物群落结构主成分分析

Fig. 4 Principal component analyses (PCA) for soil AOA (A) and AOB (B) microbial communities

OTUs。土壤 AOB 绝对丰度前 20 位 OTUs 分析结果(表 3)显示, JX-3 中 otu1618、otu487、otu2315、otu1460、otu1552、otu847、otu830 和 otu388 绝对丰度在培养前后(0 d 和 50 d)存在显著变化;JX-7 土壤中 otu1618 绝对丰度在培养前后(0 d 和 50 d)存在显著变化。

表 2 土壤 AOA 前 20 位 OTUs 的绝对丰度(10^3 copies/g 干土)
Table 2 Absolute abundances of top 20 OTUs of soil AOA

OTU 编号	JX-3		JX-7		分类属水平
	0 d	50 d	0 d	50 d	
otu1138	3.54 ± 2.51	9.13 ± 3.98	9.36 ± 0.69	23.5 ± 3.79	<i>Nitrososphaera</i>
otu563	0.18 ± 0.12	0.48 ± 0.33	5.77 ± 1.03	12.8 ± 2.11	None
otu1134	6.51 ± 6.37	9.45 ± 3.17	0.08 ± 0.12	0.05 ± 0.06	<i>Nitrososphaera</i>
otu803	0.20 ± 0.21	0.65 ± 0.22	1.48 ± 0.53	4.90 ± 2.83	<i>Nitrososphaera</i>
otu236	0.05 ± 0.09	0.04 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	<i>Nitrososphaera</i>
otu72	0.01 ± 0.02	0.07 ± 0.12	1.48 ± 1.04	7.38 ± 6.69	<i>Nitrososphaera</i>
otu46	1.73 ± 2.33	1.71 ± 0.48	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	None
otu902	0.70 ± 0.46	0.30 ± 0.40	0.02 ± 0.02	0.00 ± 0.00	None
otu330	0.28 ± 0.26	0.07 ± 0.11	0.15 ± 0.16	0.00 ± 0.00	<i>Nitrososphaera</i>
otu792	0.44 ± 0.56	0.15 ± 0.14	0.16 ± 0.26	0.01 ± 0.02	None
otu453	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.05	0.11 ± 0.06	None
otu1348	0.22 ± 0.19	0.28 ± 0.25	0.07 ± 0.13	0.14 ± 0.12	<i>Nitrososphaera</i>
otu1313	0.22 ± 0.06	0.24 ± 0.41	0.03 ± 0.05	0.10 ± 0.18	<i>Nitrososphaera</i>
otu547	0.18 ± 0.17	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	<i>Nitrososphaera</i>
otu437	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.09	<i>Nitrososphaera</i>
otu1396	0.13 ± 0.11	0.35 ± 0.15	0.36 ± 0.06	0.82 ± 0.37	<i>Nitrososphaera</i>
otu523	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.12 ± 0.09	<i>Candidatus Nitrosocosmicus</i>
otu173	0.22 ± 0.24	0.37 ± 0.28	0.12 ± 0.22	0.66 ± 0.58	<i>Nitrososphaera</i>
otu52	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	None
otu1272	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.08	0.77 ± 0.56	<i>Candidatus Nitrosocosmicus</i>

注: None 表示该 OTU 在 NCBI 数据库中没有比对结果; 黑体字的数值表明该 OTU 绝对丰度在培养时间(0 d 和 50 d)间存在显著差异($P<0.05$), 下表同。

表 3 土壤 AOB 前 20 位 OTUs 的绝对丰度(10^3 copies/g 干土)
Table 3 Absolute abundances of top 20 OTUs of soil AOB

OTU 编号	JX-3		JX-7		分类属水平
	0 d	50 d	0 d	50 d	
otu1618	0.00 ± 0.00	62.2 ± 7.30	1.69 ± 1.45	58.0 ± 5.67	<i>Nitrosospira</i>
otu487	1.62 ± 0.11	0.06 ± 0.11	1.24 ± 2.14	0.01 ± 0.02	<i>Nitrosospira</i>
otu122	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.08	2.69 ± 2.31	2.89 ± 1.68	<i>Nitrosospira</i>
otu1975	0.34 ± 0.25	0.00 ± 0.00	0.29 ± 0.51	0.00 ± 0.00	<i>Nitrosospira</i>
otu2315	0.37 ± 0.20	0.03 ± 0.05	0.30 ± 0.51	0.00 ± 0.00	<i>Nitrosospira</i>
otu1460	0.25 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.30 ± 0.52	0.00 ± 0.00	<i>Nitrosospira</i>
otu604	0.06 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.15	0.00 ± 0.00	<i>Nitrososphaera</i>
otu1552	0.14 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.16	0.00 ± 0.00	<i>Nitrosospira</i>
otu847	0.15 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.16	0.00 ± 0.00	<i>Nitrosospira</i>
otu830	0.10 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.19	0.00 ± 0.00	<i>Nitrosospira</i>
otu846	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.02	0.10 ± 0.08	0.00 ± 0.00	<i>Nitrosospira</i>

续表 3

OTU 编号	JX-3		JX-7		分类属水平
	0 d	50 d	0 d	50 d	
otu1956	0.06 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04	0.00 ± 0.00	<i>Nitrosospira</i>
otu40	0.00 ± 0.00	1.10 ± 1.90	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	<i>Sphingopyxis</i>
otu1324	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.23	0.00 ± 0.00	<i>Nitrosospira</i>
otu516	0.03 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	<i>Nitrosospira</i>
otu388	0.04 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.05	0.00 ± 0.00	<i>Nitrosospira</i>
otu1666	0.02 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.22	0.00 ± 0.00	<i>Nitrosospira</i>
otu1157	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.11	0.00 ± 0.00	<i>Nitrosomonas</i>
otu860	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.09	0.02 ± 0.02	0.08 ± 0.05	<i>Nitrosospira</i>
otu1438	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.05	0.05 ± 0.05	<i>Nitrosospira</i>

3 讨论与结论

氨氧化微生物调控的硝化作用是土壤酸化加速的主要驱动者,且硝化速率越快,土壤 pH 下降越多^[21]。本研究 JX-7 土壤硝化速率高于 JX-3,相应的土壤 pH 下降越多(图 1)。有学者对我国酸性土壤中 AOA 和 AOB 群落与土壤硝化潜势相关性进行了调查,发现氨氧化过程主要由 AOA 驱动^[11-22]。但也有大量关于 AOB 主导酸性土壤硝化作用的报道^[13-15]。而本研究通过分析氨氧化微生物丰度特征,发现所研究的酸性土壤硝化作用由 AOA 主导发生(图 2 和图 4)。虽然两个土壤 AOA 和 AOB 丰度在培养前后都有所变化,但 AOA 的变化更符合与硝化速率的关系。明显的, JX-3 土壤经过 50 d 的培养后,其硝化作用很弱, AOA 丰度没有显著变化,但 AOB 丰度显著增加。推测供试土壤只是提供了 AOB 生长的环境,但并没有刺激其硝化能力^[22]。类似的, He 等^[23]报道,施加肥料后酸性土壤 AOB 丰度增加,但 AOB 并不是硝化作用的主要驱动者。这可能是由于土壤 pH 是影响 AOB 发挥硝化能力的一个主要因素^[23-24]。

Gubry-Rangin 等^[24]研究结果表明, AOA 群落结构改变与酸性土壤硝化作用的发生密切相关。然而本研究结果显示,两个土壤 AOA 群落组成在培养前后没有显著分异(图 4A),暗示 AOA 不是主要通过改变其整体群落结构来参与硝化作用。而某些 AOA 的 OTUs 绝对丰度在培养前后有显著增加(表 2),说明 AOA 发挥其氨氧化功能主要是通过个别微生物。有学者研究表明, AOA 群落中 *Thaumarchaea group 1.1a* 和 *1.1b* 与酸性土壤硝化作用密切相关,且与土壤 pH 和底物 NH_3 浓度有关^[12, 25-27]。He 等^[23]和 Leininger 等^[27]研究发现, 泉古菌 *Crenarchaeote*

clone 是提高酸性土壤硝化作用的关键氨氧化微生物。本研究中, JX-7 土壤 AOA 中 otu1138 和 otu563 绝对丰度的显著增加说明, 供试土壤 AOA 中 *Nitrososphaera* 属的一些个别微生物种类主要参与土壤硝化过程。

前期研究中,所有可培养的 *Nitrososphaera* 最适生长 pH 均为中性(pH 6.0 ~ 8.0)^[28-29]。分子学研究表明,在中性和碱性土壤 AOA 中 *Nitrososphaera* 是优势属^[20, 30-31]。然而,越来越多的研究发现,酸性土壤氨氧化作用与 *Nitrososphaera* 密切相关^[32-33]。Lin 等^[14]和 Zhang 等^[32]分别对酸性土壤氨氧化微生物丰度进行了调查,发现 AOA 的绝大部分序列属于 *Nitrososphaera*。Wang 等^[33]利用稳定同位素核酸标记探针技术,研究表明 *Nitrososphaera* 是酸性土壤上发挥氨氧化功能的主要 AOA 类群,且其在酸性环境中是化能自养型微生物。这可能是由于 AOA 含有编码酸碱平衡的基因^[34]以及 AOA 对底物的亲和力和高于 AOB^[33];或者可能是由于该菌属微生物在适应酸性环境过程中具备了某种代谢能力以缓解低 pH 对其毒害作用^[34-35]。同时,这些结果也说明了酸性土壤上氨氧化过程的复杂性,需要我们进一步阐明。

本研究对初始 pH 相近的两个酸性土壤中硝化作用及氨氧化微生物的丰度特征和群落结构的研究结果表明, AOA 应该在所研究的酸性土壤硝化作用中扮演着关键角色, AOA 调控硝化功能的实现主要是通过增加个别微生物物种的丰度而不是改变整个群落组成。

参考文献:

- [1] 赵其国. 我国红壤的退化问题[J]. 土壤, 1995, 27(6): 281-285.

- [2] Guo J H, Liu X J, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. *Science*, 2010, 327(5968): 1008–1010.
- [3] Gruber N, Galloway J N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle[J]. *Nature*, 2008, 451(7176): 293–296.
- [4] Luo G W, Friman V P, Chen H, et al. Long-term fertilization regimes drive the abundance and composition of N-cycling-related prokaryotic groups via soil particle-size differentiation[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 116: 213–223.
- [5] Pereg L, Morugán-Coronado A, McMillan M, et al. Restoration of nitrogen cycling community in grapevine soil by a decade of organic fertilization[J]. *Soil and Tillage Research*, 2018, 179: 11–19.
- [6] Daims H, Lückner S, Wagner M. A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria[J]. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(9): 699–712.
- [7] Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, et al. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5368–5382.
- [8] Könneke M, Bernhard A E, de la Torre J R, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon[J]. *Nature*, 2005, 437(7058): 543–546.
- [9] Carey C J, Dove N C, Beman J M, et al. Meta-analysis reveals ammonia-oxidizing bacteria respond more strongly to nitrogen addition than ammonia-oxidizing Archaea[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 99: 158–166.
- [10] Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. *Nature Reviews. Microbiology*, 2018, 16(5): 263–276.
- [11] 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.
- [12] Wang C, Tang S Y, He X J, et al. The abundance and community structure of active ammonia-oxidizing Archaea and ammonia-oxidizing bacteria shape their activities and contributions in coastal wetlands[J]. *Water Research*, 2020, 171: 115464.
- [13] Huang X R, Zhao J, Su J, et al. Neutrophilic bacteria are responsible for autotrophic ammonia oxidation in an acidic forest soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 119: 83–89.
- [14] Lin Y X, Ye G P, Luo J F, et al. *Nitrososphaera* 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.
- [15] Dai S Y, Liu Q, Zhao J, et al. Ecological niche differentiation of ammonia-oxidising Archaea and bacteria in acidic soils due to land use change[J]. *Soil Research*, 2018, 56(1): 71.
- [16] Zheng M M, Wang C, Li W X, et al. Soil nutrients drive function and composition of *phoC*-harboring bacterial community in acidic soils of Southern China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2654.
- [17] Rasche F, Knapp D, Kaiser C, et al. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(3): 389–402.
- [18] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [19] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460–2461.
- [20] 蔡祖聪, 赵维. 土地利用方式对湿润亚热带土壤硝化作用的影响[J]. *土壤学报*, 2009, 46(5): 795–801.
- [21] 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.
- [22] Hu H W, Xu Z H, He J Z. Ammonia-oxidizing Archaea play a predominant role in acid soil nitrification[J]. 2014, 125:261–302.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Offre P, Prosser J I, Nicol G W. Growth of ammonia-oxidizing Archaea in soil microcosms is inhibited by acetylene[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(1): 99–108.
- [26] Zhang L M, Offre P R, He J Z, et al. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea[J]. *PNAS*, 2010, 107(40): 17240–17245.
- [27] Leininger S, Urich T, Schlöter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. *Nature*, 2006, 442(7104): 806–809.
- [28] Kim J G, Jung M Y, Park S J, et al. Cultivation of a highly enriched ammonia-oxidizing archaeon of thaumarchaeotal group I.1b from an agricultural soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(6): 1528–1543.
- [29] Gubry-Rangin C, Hai B, Quince C, et al. Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(52): 21206–21211.

- [30] Pester M, Rattei T, Flechl S, et al. amoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing Archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(2): 525–539.
- [31] Huang R, Wu Y C, Zhang J B, et al. Nitrification activity and putative ammonia-oxidizing Archaea in acidic red soils[J]. Journal of Soils and Sediments, 2012, 12(3): 420–428.
- [32] Zhang M M, Alves R J E, Zhang D D, et al. Time-dependent shifts in populations and activity of bacterial and archaeal ammonia oxidizers in response to liming in acidic soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 112: 77–89.
- [33] 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.
- [34] Lehtovirta-Morley L E, Sayavedra-Soto L A, Gallois N, et al. Identifying potential mechanisms enabling acidophily in the ammonia-oxidizing archaeon “*Candidatus nitrosotalea devanattera*”[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(9): 2608–2619.
- [35] Lehtovirta-Morley L E, Ge C R, Ross J, et al. Characterisation of terrestrial acidophilic archaeal ammonia oxidisers and their inhibition and stimulation by organic compounds[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 89(3): 542–552.