doi: 10.11838/sfsc.1673-6257.22651

水氮耦合对设施农田土壤自养和异养硝化作用的影响

曹万德,崔嘉华,李 娜,何雪莲,张玉玲,邹洪涛,张玉龙,虞 娜^{*}

(沈阳农业大学土地与环境学院,土肥资源高效利用国家工程研究中心, 农业农村部东北耕地保育重点实验室,辽宁 沈阳 110866)

摘 要:水氮措施影响设施土壤氮素的转化及硝化微生物活性,但水氮耦合对设施土壤自养和异养硝化作用差 异的影响尚不明确。以连续8年设施水氮耦合田间定位试验土壤为研究对象,控制不同土壤田间持水量(WHC) (40%WHC、60%WHC和80%WHC)进行室内微宇宙培养试验,通过添加乙炔抑制剂抑制自养硝化途径,研究水 氮耦合对设施土壤自养和异养硝化速率及参与自养硝化的氨氧化微生物的影响,分析氨氧化微生物氨氧化古细菌 (AOA)和氨氧化细菌(AOB)对自养硝化作用的贡献。结果表明,水氮耦合下,不同硝化途径NH4⁺-N、NO3⁻-N 含量以及参与自养硝化的AOA amoA和AOB amoA 基因拷贝数均有显著差异。无乙炔培养7d后,NO3⁻-N含 量显著增加,而NH4⁺-N含量显著降低,AOA amoA和AOB amoA的基因丰度显著增加。添加乙炔后,NO3⁻-N、 NH4⁺-N含量基本保持恒定,AOA amoA和AOB amoA基因丰度显著减少。水氮耦合显著影响自养和异养硝化速 率,冗余分析(RDA)表明,NH4⁺-N含量、AOB amoA、NO3⁻-N-C2H2、AOA amoA可分别解释自养和异养硝化速 率变异的68.9%、34.9%、32.8%和24.4%。设施土壤存在自养硝化和异养硝化两种途径,60%~80%WHC各施 氮处理均以自养硝化为主,占总硝化速率的65%~86%;仅40%WHC下,氮纯养分量300和525kg·hm⁻²处理 以异养硝化为主,占总硝化速率的61%~77%。AOB和AOA共同驱动自养硝化,且AOB贡献更大。 关键词:设施土壤;水氮耦合;自养硝化;异养硝化;氨氧化微生物

硝化作用是维持全球陆地和海洋生态系统氮素 循环的重要过程^[1-2],它决定着土壤氮素在还原和 氧化态之间的平衡^[3],与氮素损失密切相关。虽 然近年来在陆地氮素循环中发现了单步硝化作用, 但通常认为传统硝化作用主要包括自养和异养两种 硝化途径^[4],自养硝化中氨氧化过程是限速步骤, 是氨在化能自养型微生物的作用下由氨氧化细菌 (AOB)和氨氧化古细菌(AOA)参与完成^[5],而 异养硝化是有机态氮在真菌或NH₄⁺–N在异养硝化 微生物作用下完成^[6]。土壤自养和异养硝化占总硝 化的相对贡献除了受农田管理措施影响外,还取决 于土壤环境条件,尤其是水分条件、施氮量、酸碱 度以及碳氮比等^[7-8]。

已有研究表明,提高设施土壤肥力能显著提高 硝化速率^[9]。氮肥用量及品种均直接影响硝化过 程,表现为增施氮肥促进硝化作用发生,一般硝 化速率与施氮量呈正相关关系^[10-11]。而在长期高 氮投入的设施菜地中,土壤90%以上的氮素以有 机态形式存在, 无机态氮的利用率低, 土壤硝化 速率则表现为随无机氮用量的增加而降低^[12]。此 外,长期的干湿交替可以显著促进连续集约栽培设 施土壤的硝化作用^[13]。土壤水分含量通过影响微 生物数量和种群结构变化进而调控土壤氮素转化途 径^[14],这也是影响土壤硝化作用的重要因素。研 究表明,50% 土壤孔隙含水量(WFPS)时,以异 养硝化为主,而50%~70%WFPS时,自养硝化 随土壤湿度的增加而增加,可占总硝化速率的90% 以上^[15]。设施农田土壤独特的环境条件使得自养 硝化微生物的基因丰度显著高于大田土壤,其硝化 速率也是普通大田土壤的 3.4 ~ 10 倍 [16-17]。已有 研究表明,中-碱性土壤或者氮素充足的菜地土 壤,自养硝化作用主要由 AOB 驱动^[18],而酸性低 营养的农田土壤中,则主要由 AOA 驱动^[19]。

自养和异养硝化在不同土壤生态系统的贡献不同^[20],酸性或偏酸性耕地和草地土壤均以自养硝化为主^[21],如草地和农田土壤中异养硝化作用对

-25 -

收稿日期: 2022-10-24; 录用日期: 2023-02-14

基金项目:辽宁省重点研发计划项目(2020JH2/10200018);国家 自然科学基金项目(41401322)。

作者简介:曹万德(1996-),硕士研究生,主要从事设施土壤氮 素研究。E-mail: 1947054861@qq.com。

通讯作者: 虞娜, E-mail: sausoilyn@syau.edu.cn。

总硝化的平均贡献率为22%~25%,森林土壤占 比约37%^[22]。目前,水氮耦合对设施农田土壤氮 循环的研究主要集中在气态活性氮等方面^[23],关 于自养硝化和异养硝化相对贡献的研究主要集中于 酸性森林土壤^[21]、草地土以及水稻土^[24],在设 施土壤方面研究还较有限^[25],水氮耦合对设施土 壤自养和异养硝化的差异及相对贡献的研究尚属空 白,其硝化途径还有待深入研究。

本研究基于连续8年的设施水氮田间定位 试验,选取不同水氮耦合下的表层土壤(0~20 cm),进一步控制土壤田间持水量,通过微宇宙试 验及特异性乙炔(C₂H₂)抑制剂法^[25],研究水氮 耦合对设施农田土壤硝化作用及土壤氨氧化古菌 (AOA amoA)和氨氧化细菌(AOB amoA)基因拷 贝数的短期影响,探明不同水氮耦合下设施土壤自 养硝化和异养硝化的相对贡献,明确设施土壤水氮 耦合下氮素转化特征和供应,以期为设施土壤合理 水氮管理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地点位于沈阳农业大学科研基地内 (41°49′N, 123°34′E), 地处温带半湿润大陆性季风 气候区,年均温为7.0~8.1℃,无霜期148~180d, 日照时长为 2445.7 h。试验地始建于 2012 年,为设施 水氮调控田间定位试验。2012-2019年每年4-8月 执行相同的试验方案进行设施番茄水氮定位试验,其 余时间在棚膜遮盖下进行休闲。2020年试验地春季 处于休耕、棚膜覆盖状态。试验采用2因素3水平 随机区组设计, 共设9个处理, 分别为 W1N1、W1N2、 W_1N_3 , W_2N_1 , W_2N_2 , W_2N_3 , W_3N_1 , W_3N_2 , W_3N_3 , Ξ 中W1、W2、W3对应的灌水下限分别为25、35和45 kPa, 灌水上限均为田间持水量(WHC)即6.3 kPa (0.349 cm³ · cm⁻³), N₁、N₂、N₃ 对应氮纯养分用量分 别为 75、300、525 kg・hm⁻² (考虑作物需氮量及当地 习惯施氮量),小区面积 2.5 m²,重复 4 次。2012 年 试验开始前 0~20 cm 土壤有机质 10.9 g·kg⁻¹, 全氮 含量 1.4 g · kg⁻¹,碱解氮含量 57.8 mg · kg⁻¹,有效磷 含量 25.2 mg · kg⁻¹,速效钾含量 25.2 mg · kg⁻¹,土壤 pH7.1, 土壤类型为棕壤。

各处理除施氮肥,2012—2019 年连年统一施用 有机肥(颗粒状膨化鸡粪 26400 kg・hm⁻²,有机质 217.0 g・kg⁻¹,全氮 31.0 g・kg⁻¹)、普通过磷酸钙 - 26 — (220 kg・hm⁻²)和硫酸钾(300 kg・hm⁻²)。
 1.2 微宇宙培养试验

微宇宙培养试验的土壤样品采自 2020 年秋季, 各处理多点采集 0 ~ 20 cm 土层土壤后充分混匀, 去除石块、植物残体后过 2 mm 筛备用。

微宇宙培养试验采用室内恒温培养方法,首先 对各处理土壤进行预培养,将各处理相当于5.0g烘 干土重的风干土置于120 mL血清瓶中,对田间 W, (25 kPa, 高水分条件)、W₂(35 kPa, 中水分条件) 和 W_a(45 kPa,低水分条件)水分处理进一步对 应分别控制为 WHC 的 80%、60% 和 40%, 无菌水 调节水分含量,采用 Parafilm 封口膜,膜上用针戳 4~5个小孔,维持土壤的通气性。25℃下恒温预 培养一周,并定期称重补充水分。经预培养后的土 壤,各处理均添加(NH₄)₃SO₄,浓度为氮纯养分量 50 µg·g⁻¹土,进而反映不同水氮处理土壤本身氮 素转化能力。水分控制与预培养期相同,并用橡胶 塞及金属圈密封血清瓶。各处理均设置 30 个重复, 其中15个重复使用注射器添加硝化抑制剂C₂H₂ 1 mL, 控制 C₂H, 浓度为 1%, 另外, 15 个重复不添 加 C₂H₂ 作为对照。随后在 25℃进行暗培养 7 d,保 证培养过程是有氧状态。

1.3 土壤样品采集及无机氮观测

在培养试验的0、1、3、5和7d每次各取出3 个添加抑制剂和3个对照血清瓶,分别采集测定各 时段土壤铵态氮和硝态氨含量,并在土样采集后立 即在-80℃的超低温冰箱内保存各时段土壤样品, 以备土壤功能基因测定。

以水土比为 10:10.01 mol·L⁻¹CaCl₂ 浸提土壤 样品, AA3 自动分析仪法(Seal Analytical, USA) 测定 NO₃⁻-N 和 NH₄⁺-N 含量。

分别计算添加和不添加 C₂H₂ 的土壤净硝化速率,采用公式(1)计算:

$$N_{\rm net} = \frac{(NO_3 - N)_t - (NO_3 - N)_{int}}{t}$$
(1)

 N_{net} 是土壤净硝化速率(Nmg·kg⁻¹·d⁻¹); (NO₃⁻-N),是培养t天后土壤NO₃⁻-N含量(mg·kg⁻¹), (NO₃⁻-N)_{int}是培养初始土壤NO₃⁻-N含量(mg·kg⁻¹), t是培养天数(d)。不添加C₂H₂是土壤自养和异 养硝化速率之和,而添加C₂H₂为土壤异养硝化 速率。

1.4 DNA 提取和定量聚合酶链反应(PCR)分析 对培养 0、3、5 和 7 d 后的土壤样品进行功能

中国土壤与肥料 2023 (11)

基因分析。采用 Fast DNA[®] Spin Kit for Soil 试剂盒(MP Bio)提取土壤 DNA,称取 1.0g土壤,依照试剂盒的说明书操作提取样品 DNA,各功能基因定量PCR 过程在实时荧光 Gene 9600 定量 PCR 仪完成。

定量 PCR 所用的反应体系均为 15 μL,包含 7.5 μL SYBR® Premix EX TaqTM (Takara)、各 0.05 μL 上 下游引物、7.2 μL 灭菌双蒸水 (dd H₂O)和 0.2 μL DNA 模板。定量 PCR 所用扩增引物如表 1 所示。

表 1 基因及聚合酶链反应扩增引物

引物名称	引物序列	参考文献
AmoA19F	ATGGTCTGGCTWAGACG	[26]
CrenamoA16r48x	GCCATCCABCKRTANGTCCA	
amoA1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	[27]
amoA2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	
	引物名称 AmoA19F CrenamoA16r48x amoA1F amoA2R	引物名称引物序列AmoA19FATGGTCTGGCTWAGACGCrenamoA16r48xGCCATCCABCKRTANGTCCAamoA1FGGGGTTTCTACTGGTGGTamoA2RCCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC

1.5 数据分析

采用 SPSS 21.0 进行双因素随机区组方差分析、 多因素随机区组方差分析、重复测量方差分析和 Pearson 相关分析,功效估计(偏 η^2)比较因子的 作用大小, Duncan 法进行多重比较。Canoco 5.0 进 行冗余分析(RDA), Origin 2021 绘图,数据均为 (平均值 ± 标准误)。

2 结果与分析

2.1 土壤铵态氮和硝态氮的动态变化

由图 la、b、c可知,随着培养时间延长,未

添加 C₂H₂ 处理的铵态氮含量呈明显降低趋势,随 相对 WHC 增加,其降低幅度增加,W₁ 水分处理下 降幅度高达 67.0%。添加 C₂H₂ 处理的铵态氮含量变 化较小,基本保持恒定。多因素随机区组方差分析 表明,除 0 d 添加和未添加 C₂H₂ 对铵态氮含量影响 不显著外,水分、施氮量、添加 C₂H₂ 及水氮交互均 极显著影响铵态氮含量,且随着培养时间的延长, 添加 C₂H₂ 均极显著提高铵态氮含量。

由图 ld、e、f可知,未添加 C₂H₂ 处理的硝态氮含 量随培养时间的增加整体呈上升趋势,以 W₂N₂ 处理 上升幅度最大,增幅高达 50.8%。添加 C₂H₂ 各处理,



图 1 不同水氮耦合处理土壤铵态氮和硝态氮含量培养期间的变化

注:图例含有 C2H2 的为微宇宙试验中添加乙炔,否则为未添加乙炔处理。

— 27 —

培养期间硝态氮含量增幅较小。多因素随机区组方 差分析表明,除0和1d添加C₂H₂对硝态氮含量影 响不显著外,其余各培养时间水分、施氮量、添加 C₂H₂及水氮交互均极显著影响硝态氮含量,且添加 C₂H₂均极显著降低硝态氮含量。

2.2 土壤净硝化速率

水氮耦合对培养7d后设施土壤总硝化、自养 硝化和异养硝化速率的影响(图2a)表明,除施氮 量对自养硝化速率影响不显著外,水分、施氮量及 水氮交互均极显著影响土壤总硝化速率、自养硝化 速率和异养硝化速率。各因子对硝化速率的影响大 小表现为总硝化速率:水分>水氮交互>施氮量; 自养硝化速率:水分>水氮交互;异养硝化速率: 水氮交互>施氮量>水分。水分单一效应对自养硝 化、总硝化速率均表现为随相对WHC比例的增加 而增加,即W₁>W₂>W₃,且各水分之间均达极显著 差异(P<0.01)。水分单一效应对异养硝化速率的 影响与自养硝化速率相反,W₃极显著高于W₂和 W₁(P<0.01),且W₂和W₁差异不显著。而施氮量 对异养硝化和总硝化速率除 W_1 外,表现为 N_3 显著 高于 N_1 和 N_2 (P<0.05),且 N_1 与 N_2 差异不显著。 水氮耦合使得 W_1N_1 处理土壤总硝化速率最大,达 7.88 mg·kg⁻¹·d⁻¹,为最小速率 W_3N_2 处理的 2.41 倍。 W_1N_3 处理的自养硝化速率最大,是其他处理 的 1.02 ~ 6.06 倍。 W_3N_3 处理异养硝化速率最快, 显著高于其他处理。

进一步分析水氮耦合对自养和异养硝化速率占总 硝化速率的比值(图2b)可知,水分,施氮量及二 者交互均极显著影响自养或异养的占比,且表现为水 分>水氮交互>施氮量。以异养硝化速率占比为例, 其水分单一效应表现为随相对WHC降低,异养硝化 占比增加,W3极显著高于W2和W1,W1、W2下各施 氮处理均以自养硝化为主,尤其W1N3和W2N2处理 自养硝化占总硝化速率的80%以上。施氮量单一效 应表现为随施氮量增加,除W1外,异养硝化占比显 著增加。N1和N3施氮量下,随相对WHC降低,异 养硝化占比逐渐增加。以W3N3处理异养硝化占比最 大,而W1N3处理占比最小,自养硝化则与之相反。



注: 立柱上不同小写字母从上至下分别表示各处理的总硝化速率、异养硝化速率和自养硝化速率的差异显著性(P<0.05)。** 表示差异极显著(P<0.01); ns表示差异不显著。

2.3 土壤 AOA 和 AOB 的 amoA 丰度动态变化

水氮耦合下 AOA amoA 和 AOB amoA 基因丰度的动态变化(图3)表明,水分、施氮量及二者交互效应均显著影响二者的丰度,各水氮处理在添加 C₂H₂前后, AOA amoA 基因拷贝数均明显高于 AOB amoA。随相对 WHC 增加,添加 C₂H₂ 后,两个基 — 28 —

因丰度总体均呈现降低趋势,且 AOA amoA 下降更为明显,表现为水分含量单一效应对 C₂H₂ 添加前后各处理变化差异显著。

分别对添加和不添加 C₂H₂ 不同培养时间的 AOA amoA 和 AOB amoA 基因丰度进行重复测量方差分 析,结果表明,培养时间、水分含量、施氮量和水

分,时间和氮肥及三者交互均对添加和不添加 C_2H_2 的 AOA amoA 和 AOB amoA 基因丰度有极显著影响。 水分含量对未添加 C_2H_2 的 AOA amoA 和 AOB amoA 基因丰度分别表现为 $W_2>W_1>W_3$ 和 $W_1>W_2>W_3$;而 添加 C₂H₂ 均表现为 W₃>W₂>W₁。添加 C₂H₂ 与否, 施氮量对 AOA amoA 均表现为 N₁>N₂>N₃;未添加 C₂H₂,施氮量对 AOB amoA 表现为 N₂>N₁>N₃,而添 加 C₂H₂施氮量对 AOB amoA 则表现为 N₃>N₂>N₁。



注: a 图和 c 图为未添加 C₂H₂ 处理, b 图和 d 图为添加 C₂H₂ 处理。误差棒表示标准误(n=3)。不同小写字母表示相同培养时间不同处理在 P<0.05 水平上 差异显著。

2.4 土壤硝化速率与氨氧化微生物、无机氮含量 间的关系

为探究水氮耦合下设施土壤净硝化速率与氨氧 化微生物间的关系,对设施土壤总硝化速率(Tnr)、 自养硝化速率(Anr)、异养硝化速率(Hnr)和氨 氧化细菌基因拷贝数(AOB)、氨氧化古菌基因拷 贝数(AOA)、铵态氮、硝态氮进行 Pearson 相关性 分析,如图4所示。结果表明,Tnr与AOB呈显著 正相关关系(P<0.05),Anr与AOA、AOB分别呈显 著(P<0.05)和极显著正相关关系(P<0.01),且Tnr 仅与Anr呈极显著正相关关系(P<0.01)。铍态氮与 AOB、AOA均呈极显著负相关关系(P<0.01)。添加乙 炔后, 铵态氮和硝态氮与 Hnr 均呈极显著正相关关系 (P<0.01); 而 AOA 和 AOB 与 Hnr 均无显著相关关系。

图 5 为 Anr 和 Hnr 与 AOA、AOB 及 土 壤 无 机 氮 的冗余分析 (RDA), 第一、第二轴解释率分别为 82.05% 和 11.05%, 即 总 解 释 率 达 93.10%, 以 第一 轴为主导轴。蒙特卡洛检验表明, 第一轴 (*F*=82.3, *P*=0.002^{**}) 和所有轴的总和 (*F*=30.4, *P*=0.002^{**}) 差异 均极显著。蒙特卡洛检验排序后表明, NH₄⁺-N、AOB、NO₃⁻-N-C₂H₂ 和 AOA 对自养和异养硝化速率的影响程 度依次递减,分别解释土壤 Anr 和 Hnr 变异的 68.9%、34.9%、32.8% 和 24.4%, 这与 Pearson 相关分析结果基 本一致。水氮耦合下, Anr 与 AOB 和 AOA 均呈极显著 正相关关系 (*F*=13.4, *P*<0.01; *F*=8.1, *P*<0.01)。



图 4 水氮调控下自养、异养硝化速率与 NH₄⁺−N、NO₃⁻−N、 AOA 和 AOB 的相关分析

注: Thr 为总硝化速率, Anr 为自养硝化速率, Hnr 为异养硝化速率, AOB 为氨氧化细菌基因考贝数, AOA 为氨氧化古菌基因拷贝数。指标含 C₂H₂ 为培养中添加 C₂H₂ 处理,否则为不加; ns 表示相关不显著; *表示显著相关(P<0.05); **表示极显著相关(P<0.01)。下同。



图 5 硝化速率与 NH₄⁺−N、NO₃⁻−N、AOA 和 AOB 的冗余 分析

3 讨论

— 30 —

3.1 水氮耦合对设施农田土壤自养硝化和异养硝 化的影响

本研究发现,在 $25 \, \mathbb{C}$ 微宇宙培养试验中,水 氮耦合所有未添加 C_2H_2 处理硝态氮含量增加而铵 态氮含量降低,添加 C_2H_2 处理的铵态氮含量显著 高于不加 C_2H_2 处理,而硝态氮则低于不添加 C_2H_2 的处理(图1)。这一结果表明,自养和异养硝化 同时存在,该结果与Liu等^[28]的研究结果一致。 这与添加1% C₂H₂可使 AOA 和 AOB 中氨氧化单加 氧酶(AMO)失活,完全抑制自养硝化,而异养 硝化菌产生的氨单加氧酶不受 C₂H₂抑制有关^[29]。 60% ~ 80%WHC 的各施氮处理在添加乙炔后,土 壤硝态氮含量基本保持稳定(图1d、e),表明自 养硝化是硝态氮产生的主要过程,是本研究设施土 壤主要的硝化途径。

本研究中, AOA amoA 和 AOB amoA 基因丰度在W₁、W₂水分条件下各施氮处理均显著大于W₃(图3);同时,随WHC百分比增加,总硝化速率、自养硝化速率增加(图2),即W₁>W₂>W₃,且W₁、W₂、W₃间差异极显著。W₁N₃时自养硝化速率最快,达到6.28 mg·kg⁻¹·d⁻¹,这与已有的研究结果基本一致^[30]。土壤含水量是影响土壤含氧量及其通气性的关键因子,同时调控土壤微生物的活性及其主导的硝化过程^[31]。当土壤水分含量满足微生物代谢活动及氧气的扩散条件时,土壤硝化作用最为活跃^[32]。80%WHC土壤水分更利于土壤为AOA和AOB的生长提供氮源作为营养物质,加快硝化底物铵态氮的消耗,促进硝化作用发生。

本研究中异养硝化速率在 W_3 水分条件下最大, 且显著高于 W_1 和 W_2 (图 2),这与前人研究结果 基本一致^[2]。 W_3 为 40% WHC,其水分条件相对干 燥,而异养硝化微生物更喜欢较干燥的环境条件, 如参与异养硝化的真菌和放线菌比自养硝化细菌更 耐受干燥土壤环境^[33]。前人研究表明,土壤异养 硝化速率和土壤含水量呈负相关关系,高水分含量 不利于异养硝化细菌的生长^[17]。 W_2 、 W_3 水分条件 下,异养硝化速率随施氮量的增加而逐渐增加,在 N_3 时达到最大(图 2),这可能与富氮土壤为异养 硝化微生物提供更多可利用能量有关。Cai 等^[34] 的研究也表明,异养微生物更易于在自养硝化细菌 不利的环境中进行硝化,这进一步解释了 W_3 水分 的异养硝化速率最大的原因。

3.2 水氮耦合下 AOA 和 AOB 对自养硝化作用的贡献

本研究中,添加 C_2H_2 处理的AOB amoA和 AOA amoA 基因拷贝数均有所下降(图3),表 明AOA和AOB共同参与自养硝化^[35],在培养条 件下,低浓度 C_2H_2 (1%)完全抑制氨氧化微生物 (AOA、AOB)的氨氧化酶活性,抑制自养硝化的第 一步^[36]。其中,AOA amoA 降低更为显著,这可能 是 AOA 和 AOB 的羟胺氧化还原酶活性的差异^[37], 在不同环境条件其敏感性不同。C₂H₂ 对自养硝化的 抑制作用受土壤温度、酸碱度、水分等多环境条件 的影响^[38]。本研究中,不同水氮处理创造的环境 条件的差异可能是引起 AOA 和 AOB 对自养硝化的 相对贡献差异的主要因子。

本研究土壤采自设施田间定位试验,由于试验 地连续多年施氮,土壤酸化现象较为明显(培养期 间土壤 pH 介于 5.41 ~ 6.42, 文中未列出), AOA amoA 基因拷贝数明显高于 AOB amoA (图3),这 是因为 AOA 在偏酸性土壤中具有独特的生物化学 及遗传学特征,其对氨的亲和力约为 AOB 的 200 倍,更能适应低 pH 及寡氮的营养环境^[39],这与连 续6年高氮投入设施菜地的研究结果一致^[40]。此 外,本研究相同水分下,AOA 基因拷贝数在 N₃ 水 平明显小于 N1、N2, AOB 基因拷贝数则在 N2 水平 最高(图3),这与试验地前期结果基本一致^[23], 且与高施氮量下 AOB 和 AOA 的 amoA 基因丰度显 著降低的研究结果一致^[40-42]。本研究中, AOA 和 AOB 均与铵态氮呈极显著负相关(图4),这可能 是 AOA 和 AOB 活性增强,加速了氨氧化过程,使 铵态氮含量降低。前人在农田土壤的研究指出, AOA 尽管在数量和生态位都占有优势,但对驱动 自养硝化并未发挥主要作用^[43]。本研究的设施定 位土壤, 氮肥连年投入创造高氮环境的同时, 频繁 灌溉使得 AOA 和 AOB 在特定生态位的作用存在差 异^[44], AOB 在高氮环境的氨氧化过程发挥更重要 的作用,这与已有的研究结果一致^[18,43]。Pearson 相关和冗余分析均表明, AOB 与自养硝化速率具有 更高的相关性(图4和图5),是影响自养硝化速 率的主要因子,其贡献更大,这与菜地土壤 AOB 基因丰度与自养硝化速率存在极显著正相关的报道 一致^[25]。其他研究也证实, AOB amoA 的基因丰度 与硝化潜势(PAO)存在显著正相关关系,在驱动 土壤氨氧化过程中发挥更重要的作用^[40]。

微宇宙试验中,水分、氮素及水氮耦合对氨氧 化微生物活性及自养和异养硝化速率均有显著影响 (图2,图3),以水分或水氮交互作用效应更大, 这与供试土壤为水氮定位试验密不可分。连年氮肥 投入,各处理土壤氮素均处于高氮环境,为异养硝 化微生物和 AOB 提供了充足的氮素营养,水分及 水氮耦合使得不同处理自养和异养硝化过程及氨氧 化微生物贡献产生差异并发挥重要作用。

4 结论

水分、施氮量及二者交互不同程度地影响了 微宇宙培养试验中设施土壤铵态氮含量、硝态氮 含量、AOA amoA 和 AOB amoA 基因丰度。设施农 田土壤同时存在自养和异养两种硝化途径,自养 硝化是主要的硝化途径。水氮因素以水分对自养 硝化和异养硝化速率及占总硝化速率的比例影响 最大,60%~80% WHC 条件以自养硝化为主要途 径,40% WHC 以异养硝化为主要途径。水氮耦合 使得灌水下限 25 kPa 和氮纯养分用量 525 kg・hm⁻² (W₁N₃)处理自养硝化速率最大,而灌水下限 45 kPa 和氮纯养分用量 525 kg・hm⁻²(W₃N₃)处理异 养硝化速率最大。自养硝化微生物 AOA 和 AOB 共 同驱动自养硝化,二者分别与自养硝化速率呈显著 或极显著正相关。AOA 的基因丰度显著高于 AOB, 但 AOB 对自养硝化的贡献更大。

参考文献:

- [1] 郭志英, 贾仲君. 中国典型生态系统土壤硝化强度的整合分析[J]. 土壤学报, 2014, 51(6): 1317-1324.
- [2] 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.
- [3] Liu R, Suter H, He J Z, et al. Influence of temperature and moisture on the relative contributions of heterotrophic and autotrophic nitrification to gross nitrification in an acid cropping soil [J]. Journal of Soils & Sediments, 2015, 15: 2304–2309.
- [4] Zhang Y S, Zheng X Z, Guo B L, et al. Mechanisms behind the inhibition of autotrophic nitrification following rice-straw incorporation in a subtropical acid soil [J]. Soil and Tillage Research, 2020, 196: 104436.
- [5] 濯辉亮,张丽辉,王贵,等.盐碱草甸植被退化对土壤硝化作用强度的影响[J].水土保持研究,2021,28(2):21-26.
- [6] Zhang J B, Sun W J, Zhong W H, et al. The substrate is an important factor in controlling the significance of heterotrophic nitrification in acidic forest soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 76: 143-148.
- [7] Cheng Y, Wang J, Chang S X, et al. Nitrogen deposition affects both net and gross soil nitrogen transformations in forest ecosystems: A review [J]. Environmental Pollution, 2019, 244: 608-616.
- [8] Duan P P, Zhang X, Zhang Q Q, et al. Field-aged biochar stimulated N₂O production from greenhouse vegetable production soils by nitrification and denitrification [J]. Science of The Total Environment, 2018, 642: 1303-1310.

— 31 —

中国土壤与肥料 2023 (11)

- [9] 王先芳. 花生壳生物炭对设施菜地土壤硝化作用的影响及其 微生物学机制[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020.
- [10] 赵普生,韩苗,熊子怡,等.长期定位施肥对中性紫色土硝 化作用及氨氧化微生物的影响[J].中国土壤与肥料,2018
 (5):85-90.
- [11] 佟德利,徐仁扣. 三种氮肥对红壤硝化作用及酸化过程影响的 研究[J]. 植物营养与肥料学报,2012,18(4):853-859.
- [12] 武星魁,施卫明,徐永辉,等.长期不同化肥氮用量对设施菜地土壤氮素矿化和硝化作用的影响[J].土壤,2021,53
 (6):1160-1166.
- [13] Chen Q H, Feng Y, Zhang Y P, et al. Short-Term Responses of nitrogen mineralization and microbial community to moisture regimes in greenhouse soils [J]. Pedosphere, 2012, 22 (2): 263-272.
- [14] Szukics U, Abell G C, Hodl V, et al. Nitrifiers and denitrifiers respond rapidly to changed moisture and increasing temperature in a pristine forest soil [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 72 (3): 395-406.
- [15] 王亚男,曾希柏,王玉忠,等.设施蔬菜种植年限对氮素 循环微生物群落结构和丰度的影响[J].应用生态学报, 2014,25(4):1115-1124.
- [16] 李大朋,曹文志,王吉苹,等. 闽南农业流域土壤氮矿化作 用初步研究[J]. 土壤通报,2008,39(1):47-51.
- [17] Chen Z M, Ding W X, Xu Y H, et al. Importance of heterotrophic nitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in a cropland soil: evidences from a ¹⁵N tracing study to literature synthesis [J]. Soil Biology Biochemistry, 2015, 91: 65-75.
- [18] 陈安枫,张溪,张前前,等.菜地氨氧化微生物驱动的 N₂O和NO对有机无机肥配施的响应[J].环境科学学报, 2021,41(8):3374-3383.
- [19] 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: 566–574.
- [20] Liu R, Suter H, Hayden H, et al. Nitrate production is mainly heterotrophic in an acid dairy soil with high organic content in Australia [J]. Biology and Fertility of Soils, 2015, 51: 891– 896.
- [21] Lan T, Liu R, Suter H, et al. Stimulation of heterotrophic nitrification and N₂O production, inhibition of autotrophic nitrification in soil by adding readily degradable carbon [J]. Journal of Soils & Sediments, 2020, 20: 81–90.
- [22] Zhang J B, Müller C, Zhu T B, et al. Heterotrophic nitrification is the predominant NO₃⁻ production mechanism in coniferous but not broad-leaf acid forest soil in subtropical China [J]. Biology & Fertility of Soils, 2011, 47: 533–342.
- [23] 吕金东,张丽媛,虞娜,等.水氮耦合对设施土壤 N₂O 和 NO 排放的影响[J].农业环境科学学报,2021,40(6): 1366-1376.
- [24] Islam A, Chen D, White R. E. Heterotrophic and autotrophic nitrification in two acid pasture soils [J]. Soil Biology &

Biochemistry, 2007, 39 (4): 972-975.

- [25] Dan X Q, Meng L, He M Q, et al. Regulation of nitrogen acquisition in vegetables by different impacts on autotrophic and heterotrophic nitrification [J]. Plant Soil, 2022, 474: 581-594.
- [26] 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 & Sediments, 2021, 21 (4): 1800-1814.
- [27] Liu H Y, Hu H W, Huang X, et al. Canonical ammonia oxidizers, rather than comammox Nitrospira, dominated autotrophic nitrification during the mineralization of organic substances in two paddy soils [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2021, 156: 108192.
- [28] Liu R, Hayden H, Suter H, et al. The effect of nitrification inhibitors in reducing nitrification and the ammonia oxidizer population in three pH-contrasting soils [J]. Journal of Soils & Sediments, 2015, 15 (5): 1113-1118.
- [29] Zhang Q, Li Y, He Y, et al. Nitrosospira cluster 3-like bacterial ammonia oxidizers and Nitrospira-like nitrite oxidizers dominate nitrification activity in acidic terrace paddy soils [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2019, 131: 229-237.
- [30] 栗方亮,李忠佩,刘明,等. 氮素浓度和水分对水稻土硝化 作用和微生物特性的影响[J]. 中国生态农业学报,2012, 20(9):1113-1118.
- [31] 郑欠,丁军军,李玉中,等.土壤含水量对硝化和反硝化 过程 N₂O 排放及同位素特征值的影响[J].中国农业科学, 2017,50(24):4747-4758.
- [32] He J Z, Hu H W, Zhang L M. Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils [J].
 Soil Biology & Biochemistry, 2012, 55 (6): 146–154.
- [33] Manzoni S, Schimel J P, Porporato A, et al. Responses of soil microbial communities to water stress: results from a metaanalysis [J]. Ecology, 2012, 93 (4): 930–938.
- [34] Cai Y J, Ding W X, Zhang X L, et al. Contribution of heterotrophic nitrification to nitrous oxide production in a longterm N-fertilized arable black soil [J]. Communication in Soil Science and Plant Analysis, 2010, 41 (19): 2264-2278.
- [35] Faeflen J S, Li S W, Xin X P, et al. Autotrophic and heterotrophic nitrification in a highly acidic subtropical pine forest soil [J]. Pedosphere, 2016, 26 (6): 904–910.
- [36] Rütting T, Schleusner P, Hink L, et al. The contribution of ammoniaoxidizing archaea and bacteria to gross nitrification under different substrate availability [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2021, 160: 108353.
- [37] Walker C B, Torre J R, Klotz M G. Nitrosopumilus maritimus genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea [J]. Proceedings of The National Academy of Sciences, 2010, 107 (19): 8818–8823.
- [38] Liu R, Hayden H L, Hu H W. Effects of the nitrification inhibitor acetylene on nitrous oxide emissions and ammoniaoxidizing microorganisms of different agricultural soils under

— 32 —

laboratory incubation conditions [J]. Applied Soil Ecology, 2017, 119: 80-90.

- [39] 熊旭梅,周雪,蒋先军,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,2021,11
 (9):1-12.
- [40] Zhong W H, Bian B Y, Gao N, et al. Nitrogen fertilization induced changes in ammonia oxidation are attributable mostly to bacteria rather than archaea in greenhouse–based high N input vegetable soil [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2016, 93: 150–159.
- [41] 毛新伟,程敏,徐秋芳,等. 硝化抑制剂对毛竹林土壤 N₂O 排放和氨氧化微生物的影响[J]. 土壤学报,2016,53(6): 1528-1540.
- [42] Lu X D, Bottomley P J, Myrold D D, et al. Contributions of ammonia-oxidizing archaea and bacteria to nitrification in Oregon forest soils [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2015, 85: 54-62.
- [43] Prosser J I, Hink L D, Gubbry R G, et al. Nitrous oxide production by ammonia oxidizers: physiological diversity, niche differentiation and potential mitigation strategies [J]. Global Change Biology, 2020, 26: 103-118.
- [44] Wang D D, Sheng K, Zhao W D, et al. Dominance of archaeal ammonia-oxidizers in soil nitrification across different soil types and fertilities in North China plain [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2021, 106: 103354.

Interactive effects of water and nitrogen on autotrophic and heterotrophic nitrification in greenhouse soil

CAO Wan-de, CUI Jia-hua, LI Na, HE Xue-lian, ZHANG Yu-ling, ZOU Hong-tao, ZHANG Yu-long, YU Na^{*} [College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, National Engineer Research Center for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources, Key Laboratory of Arable Land Conservation (Northeast China), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shenyang Liaoning 110866]

Abstract: Water and nitrogen measures affect nitrogen conversion and nitrifying microbial activity in greenhouse soil, but the difference between autotrophic and heterotrophic nitrification under the interactive effects of water and nitrogen remains unclear. From an eight-year long term field experiment of irrigation and nitrogen in greenhouse, the greenhouse soils were used as the experimental soil, and an indoor microcosm experiment was conducted to control soil water holding capacity (WHC) (40% WHC, 60% WHC and 80% WHC) and add acetylene inhibits heterotrophic nitrification. The interactive effects of water and nitrogen on soil autotrophic and heterotrophic nitrification rates and ammonia oxidizing microorganisms were explored, and the contribution of ammonia oxidizing microorganisms ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) to nitrification was also investigated. The results showed that NH4+-N and NO3--N contents, copy number of AOA amoA and AOB amoA genes had significant difference in different nitrification pathways under the interactive effects of water and nitrogen. After 7 days incubation without acetylene, NO₃⁻-N content was increased significantly, while NH4+-N content was decreased significantly. The gene abundance of AOA amoA and AOB amoA were increased significantly. After adding acetylene, NO₃⁻-N and NH₄⁺-N content remained constant, the gene abundance of AOA amoA and AOB amoA decreased significantly. The interactive effects of water and nitrogen had a significant effect on the autotrophic and heterotrophic nitrification rates. Redundancy analysis indicated that NH4+-N content, AOB amoA, NO3-N-C2H2, and AOA amoA could explain 68.9%, 34.9%, 32.8% and 24.4% of the variation in autotrophic and heterotrophic nitrification rate, respectively. There are two nitrification pathways of autotrophic and heterotrophic nitrification in the greenhouse soils. All nitrogen treatments were dominated by autotrophic nitrification under 60%-80% WHC, accounting for 65%-86% of total nitrification rate. Heterotrophic nitrification was the main nitrification pathway only under 300 and 525 kg · hm⁻² treatments of 40% WHC, accounting for 61%-77% of total nitrification rate. Both AOA amoA and AOB amoA can drive the autotrophic nitrification, and AOB amoA has more contribution.

Key words: greenhouse soil; interactive effect of water and nitrogen; autotrophic nitrification; heterotrophic nitrification; ammonia-oxidizing microorganisms