

刘红梅, 张海芳, 秦洁, 等. 模拟氮沉降对贝加尔针茅草原土壤氮转化微生物的影响[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(10): 2386–2394.

LIU Hong-mei, ZHANG Hai-fang, QIN Jie, et al. Effects of simulated nitrogen deposition on soil nitrogen-transforming microorganisms in *Stipa baicalensis* steppe[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(10): 2386–2394.

模拟氮沉降对贝加尔针茅草原土壤氮转化微生物的影响

刘红梅, 张海芳, 秦洁, 王慧, 张艳军, 杨殿林*

(农业农村部环境保护科研监测所, 农业农村部产地环境污染防治重点实验室/天津市农业环境与农产品安全重点实验室, 天津 300191)

摘要: 草地土壤是温室气体重要的源和汇, 认识草地生态系统氮转化过程有助于预测氮循环对未来氮沉降增加的响应与反馈机制。依托于2010年在内蒙古贝加尔针茅草原设置的长期模拟氮沉降增加的氮添加试验, 共设置了8个氮添加水平(0、15、30、50、100、150、200、300 kg N·hm⁻²·a⁻¹)。应用荧光定量PCR方法, 研究氮转化功能基因丰度对不同氮添加水平的响应。2015年8月取样分析结果表明: 固氮微生物(*nifH*)基因丰度随着氮添加水平的升高, 表现为先升高后降低的趋势。低于200 kg N·hm⁻²·a⁻¹硝酸铵处理有利于固氮菌生长。低氮添加(N15、N30和N50)对氨氧化细菌(AOB-*amoA*)和氨氧化古菌(AOA-*amoA*)基因丰度无显著影响。高氮添加(N100、N150、N200和N300)显著提高了AOB基因丰度, 降低了AOA基因丰度。高氮添加(N150、N200和N300)显著降低了*nirK*基因丰度。随着氮添加量的增加, 高氮添加促进了AOB主导的氨氧化过程, 而反硝化微生物丰度的减少提高了氨氧化产物硝酸盐的积累, 继而提高了土壤硝酸盐含量。

关键词: 氮添加; 固氮微生物; 氨氧化细菌; 氨氧化古菌; 反硝化细菌

中图分类号: S154 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2019)10-2386-09 doi:10.11654/jaes.2019-0231

Effects of simulated nitrogen deposition on soil nitrogen-transforming microorganisms in *Stipa baicalensis* steppe

LIU Hong-mei, ZHANG Hai-fang, QIN Jie, WANG Hui, ZHANG Yan-jun, YANG Dian-lin*

(Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Original Agro-Environmental Pollution Prevention and Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Tianjin Key Laboratory of Agro-Environment and Agro-Product Safety, Tianjin 300191, China)

Abstract: Grasslands serve as the main sources and sinks of greenhouse gases. Understanding nitrogen (N) transformations in grassland ecosystems would contribute substantially to assessments of their response and feedback to changes in N deposition. To determine the responses of N-transforming microorganism in grassland soil to N deposition, a simulated change in N deposition via N addition (0, 15, 30, 50, 100, 150, 200, and 300 kg N·hm⁻²·a⁻¹) was set up on *Stipa baicalensis* steppe in Inner Mongolia in 2010. The abundance of N functional genes was determined using real-time PCR. Results based on samples collected in August 2015 showed that concomitant with an increase in the amount of added N, the abundance of the *nifH* gene of nitrogen-fixing organisms showed an initial increase and subsequent decrease. Moreover, the addition of ammonium nitrate N (0~200 kg N·hm⁻²·a⁻¹) promoted an increase in the abundance of the *nifH* gene. Low-N addition did not have a significant effect on the abundance of the AOB-*amoA* and AOA-*amoA* genes of ammonia-oxidizing bacteria, whereas high-N addition (N100, N150, N200, and N300) significantly increased the abundance of the AOB-*amoA* gene and decreased the abundance of the AOA-*amoA* gene of ammonia-oxidizing archaea. Similarly, high-N addition (N150, N200, and N300) reduced the

收稿日期: 2019-03-05 录用日期: 2019-06-11

作者简介: 刘红梅(1976—), 女, 河北沧州人, 副研究员, 从事生物多样性与生态农业研究。E-mail: liuhongmei@caas.cn

*通信作者: 杨殿林 E-mail: yangdianlin@caas.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(41877343)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(41877343)

abundance of the *nirK* gene of denitrifying bacteria. Furthermore, in response to an increase in N addition, mowing promoted AOB-driven ammonia oxidation, whereas a lower abundance of denitrifiers mitigated the accumulation of nitrate originating from ammonia oxidation, resulting in a high content of soil nitrate.

Keywords: nitrogen addition; nitrogen-fixation organism; ammonia-oxidizing bacteria; ammonia-oxidizing archaea; denitrifier

大气氮沉降增加呈现全球化趋势,我国是继欧洲、北美之后的第3大氮沉降区,大气氮沉降远高于全球平均水平^[1]。大气氮沉降借助其对土壤碳固定^[2]、植物氮素利用等的直接或间接作用^[3],极大地干预了生态系统碳蓄积和氮素重新分配过程^[4-5]。高氮沉降导致土壤氮转化过程发生变化^[6]、土壤可利用性氮含量增加^[7]、氮循环微生物数量及组成发生变化^[8],进而对生态系统产生影响。

土壤氮转化主要过程包括生物固氮作用、氨化作用、硝化作用和反硝化作用,这些过程都由土壤微生物所驱动。氮沉降进入土壤后的一系列转化离不开与氮素转化的相关微生物参与。近年来的研究表明,施氮肥显著影响固氮菌、硝化菌和反硝化菌群落结构和丰度^[8]。适量氮肥添加提高固氮菌丰度,促进土壤微生物的固氮功能^[9];高浓度无机氮添加抑制固氮菌生长^[10],从而抑制固氮微生物生长。Ning等^[11]研究发现氮相关功能基因对氮添加速率表现出不同的敏感性,氨氧化细菌 AOB-*amoA* 基因比氨氧化古菌 AOA-*amoA* 基因对氮添加更加敏感。土壤氨氧化细菌丰度随氮添加量增加而增加,而氨氧化古菌丰度则无明显变化^[12]。氮肥种类和氮肥施用量会影响土壤氨氧化微生物组成和丰度^[13]。受氮素限制的黄土高原盐碱草地,施氮后显著地提高了微生物生物量氮转化速率^[14]。在亚热带森林、温带森林中研究发现, N_2O 排放、 CH_4 吸收与 AOA、AOB 群落丰度分别呈现正、负相关关系,氨氧化菌群落动态能够解释土壤 CH_4 吸收和 N_2O 排放之间的消长作用^[15]。

目前,在氮沉降增加的背景下,针对干旱和半干旱草原土壤氮转化功能基因丰度对氮沉降增加的响应特征还不够明确。为此,本研究通过施氮模拟氮沉降增加,研究不同氮添加水平对涉及土壤氮循环中的固氮 *nifH* 基因、氨氧化细菌 AOB-*amoA* 基因、氨氧化古菌 AOA-*amoA* 基因和反硝化基因 *nirK* 丰度的影响,通过分析氮转化功能基因丰度与土壤理化因子之间的相关性关系,研究氮添加对微生物介导的固氮、氨氧化和反硝化过程的影响及其反馈,为深入认识草地生态系统氮循环及其对氮沉降增加的响应机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况与样地设置

研究区域概况、试验样地设置及试验前植被类型和基本理化性质详见参考文献[16]。试验样地位于内蒙古贝加尔针茅草原(48°27'~48°35'N, 119°35'~119°41'E)。于2010年开始进行围栏试验,氮添加水平设置参考国际上同类研究试验^[17-18]。氮添加处理设8个水平,依次为:0、15、30、50、100、150、200、300 kg N·hm⁻²·a⁻¹,分别记为:对照N0,低氮(N15、N30和N50),高氮(N100、N150、N200和N300)。

氮素为NH₄NO₃,每年6月中旬和7月中旬进行氮添加。共设置8个处理水平,4次重复。小区面积8 m×8 m,小区间设置2 m隔离带,重复间设置5 m隔离带。

1.2 样品采集与处理

土壤样品采集于2015年8月中旬,用土钻在各小区采集0~10 cm土壤样品,每小区采集10个点,混合均匀。去除土壤入侵物和根系,将土壤样品分为两份,一份保存于冰盒中带回实验室,存于-20℃冰柜中;一份土壤样品于室内自然风干。

1.3 测定方法

土壤理化性质测定:土壤pH采用玻璃电极法(土水比1:2.5),土壤总有机碳测定采用重铬酸钾外加热法,土壤全氮用凯氏定氮法,土壤铵态氮和硝态氮含量采用氯化钾溶液提取-流动分析仪(QC8000)测定^[19]。土壤微生物生物量氮采用氯仿熏蒸-K₂SO₄提取-TOC仪(Multi N/C 3000)测定^[20]。土壤可溶性氮以测定土壤微生物生物量氮时未熏蒸土壤的全氮含量表示,土壤可溶性有机氮以土壤可溶性氮减去铵态氮和硝态氮的差值表示^[21]。

土壤DNA提取:称取0.25 g在冰柜中保存的土壤样品,用PowerSoil® DNA Isolationkit试剂盒,按照说明书提取土壤总DNA。用Nanodrop2000超微量分光光度计和1%琼脂糖电泳检测DNA质量。将通过质量检测的DNA样品于-20℃冰箱保存待用。

标准品配制:用目的基因引物进行PCR扩增。PCR反应体系为50 μL,包括上下游引物各1 μL,模

板 1 μL , 2 \times Taq MasterMix 25 μL , 灭菌超纯水 22 μL 。扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 预变性后; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 30 个循环; 最后 1 轮循环完成后再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应完毕后, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查扩增结果, 目的片段进行琼脂糖凝胶回收。将回收 PCR 产物连接至 pMD18-T 载体, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 经 Amp⁺、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板筛选阳性克隆, 送去生工生物有限公司进行序列测定分析。

标准曲线制作: 通过做预实验, 将 4 种提取测序正确的质粒标准品从 10¹~10⁵ 倍进行 10 倍稀释, 每个梯度取 2 μL 做模板建立标准曲线。

定量 PCR 检测: 土壤固氮基因 *nifH*、氨氧化细菌 AOB、氨氧化古菌 AOA 和反硝化细菌定量扩增引物见表 1。扩增反应体系总体积为 20 μL , 包括 2 \times GoT-aq[®]qPCR Master Mix 10 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的上下游引物各 0.5 μL , DNA 模板 2 μL (1~10 ng), 灭菌超纯水 7 μL 。将加好样的 96-PCR 板置于荧光定量 PCR 仪进行扩增反应, 每个样品 3 个重复。扩增反应条件为

95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环。

1.4 数据处理

应用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)、Pearson 相关性分析。

2 结果与分析

2.1 氮沉降对土壤化学性质的影响

连续 6 年不同氮添加处理下, 土壤化学性质变化见表 2。高氮添加 (N100、N150、N200 和 N300) 土壤有机碳、硝态氮和微生物生物量氮含量高于或显著高于低氮添加 (N15、N30 和 N50) 和对照 N0。7 个氮添加处理的土壤 pH 均低于或显著低于对照 N0, 且高氮添加 pH 显著低于低氮添加。土壤全氮含量在不同氮添加处理间无显著差异。

2.2 氮沉降对土壤氮转化功能基因丰度的影响

固氮微生物功能基因 *nifH* 丰度在各氮添加处理中的变化范围在 5.26 \times 10⁵~1.43 \times 10⁶ copies $\cdot\text{g}^{-1}$ soil 之间 (图 1A)。随着氮添加水平的升高, *nifH* 丰度表现

表 1 定量 PCR 扩增引物

Table 1 Amplification primer of quantitative PCR

基因 Gene	引物 Primers	引物序列 (5' to 3') Primers sequences	片段长度 Fragment length	参考文献 References
<i>nifH</i>	<i>nifH</i> 上游引物	AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC	432	[22]
	<i>nifH</i> 下游引物	TTGTTSGCSGCRATACATSGCCATCAT		
AOB- <i>amoA</i>	<i>amoA</i> -AOB 上游引物	GGGGTTTCTACTGGTGGT	491	[23]
	<i>amoA</i> -AOB 下游引物	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
AOA- <i>amoA</i>	<i>amoA</i> -AOA 上游引物	STAATGGTCTGGCTTAGACG	635	[24]
	<i>amoA</i> -AOA 下游引物	CACCGTTTACTGCCAGGACT		
<i>nirK</i>	<i>nirK</i> 上游引物	GGMATGGTKCCSTGGCA	515	[25]
	<i>nirK</i> 下游引物	GCCTCGATCAGRTTRTGG		

表 2 不同氮添加处理下土壤化学性质

Table 2 Soil chemical properties in different nitrogen addition treatments

处理 Treatment	pH	有机碳 Total organic C/ g $\cdot\text{kg}^{-1}$	全氮 Total N/g $\cdot\text{kg}^{-1}$	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N/mg $\cdot\text{kg}^{-1}$	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N/mg $\cdot\text{kg}^{-1}$	可溶性有机氮 Soluble organic N/ mg $\cdot\text{kg}^{-1}$	微生物生物量氮 Microbial biomass N/ mg $\cdot\text{kg}^{-1}$
N0	6.98 \pm 0.16a	39.43 \pm 0.47cd	2.31 \pm 0.21a	1.82 \pm 0.04e	27.42 \pm 1.28c	36.08 \pm 1.94d	37.25 \pm 3.57e
N15	6.85 \pm 0.03a	38.79 \pm 0.22d	2.41 \pm 0.39a	1.92 \pm 0.23e	21.11 \pm 0.43d	34.41 \pm 0.39d	38.30 \pm 1.39e
N30	6.54 \pm 0.01b	35.70 \pm 0.77d	2.26 \pm 0.22a	2.93 \pm 0.24e	30.97 \pm 2.24c	69.79 \pm 7.35b	33.77 \pm 2.05e
N50	6.43 \pm 0.03b	39.75 \pm 0.58cd	2.27 \pm 0.20a	2.82 \pm 0.07e	66.26 \pm 2.06a	37.05 \pm 0.20d	36.63 \pm 1.94e
N100	5.99 \pm 0.12c	40.04 \pm 0.41c	2.50 \pm 0.38a	9.90 \pm 0.13d	61.16 \pm 3.88b	58.69 \pm 0.69c	56.19 \pm 3.43d
N150	5.77 \pm 0.09d	44.57 \pm 0.43b	2.56 \pm 0.09a	37.67 \pm 0.48c	27.60 \pm 0.85c	60.22 \pm 0.83c	72.34 \pm 0.68c
N200	5.70 \pm 0.06d	44.87 \pm 0.50b	2.33 \pm 0.13a	48.09 \pm 1.46b	29.25 \pm 1.05c	55.50 \pm 0.39c	86.93 \pm 4.23b
N300	5.19 \pm 0.05e	61.42 \pm 0.50a	2.39 \pm 0.56a	66.21 \pm 0.98a	30.32 \pm 0.80c	103.23 \pm 0.83a	123.24 \pm 3.58a

注: 同一列不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters within the same column indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

为先升高后降低的趋势,其中N50处理是对照N0的2.39倍。N15、N30、N50、N100、N150和N200处理*nifH*丰度高于或显著高于对照N0。N300处理*nifH*丰度低于对照N0,但无显著差异($P>0.05$)。

氨氧化细菌AOB-*amoA*基因丰度在各氮添加处理中的变化范围为 $1.33\times 10^7\sim 2.48\times 10^7$ copies·g⁻¹ soil之间(图1B)。N15、N30和N50处理AOB-*amoA*基因丰度与对照相比无显著差异($P>0.05$),高氮添加(N100、N150、N200和N300)AOB-*amoA*基因丰度均显著高于对照N0($P<0.05$)。表明氮沉降增加使AOB-*amoA*基因丰度提高。氨氧化古菌AOA-*amoA*

基因丰度在各氮添加处理中的变化范围为 $2.56\times 10^6\sim 3.97\times 10^6$ copies·g⁻¹ soil之间(图1C)。N30处理AOA-*amoA*基因丰度最高,但与对照相比无显著差异,其他6个氮添加处理均低于对照N0。土壤中AOB的基因拷贝数远高于AOA基因拷贝数,且高氮添加显著提高了AOB/AOA比值(图1E)。

土壤反硝化功能基因*nirK*丰度在不同氮添加处理中的变化范围为 $2.88\times 10^7\sim 7.53\times 10^7$ copies·g⁻¹ soil之间(图1D)。N15处理*nirK*基因丰度低于对照N0,但无显著差异($P>0.05$);N30、N50和N100处理*nirK*基因丰度均显著高于对照N0($P<0.05$);高氮添加处理

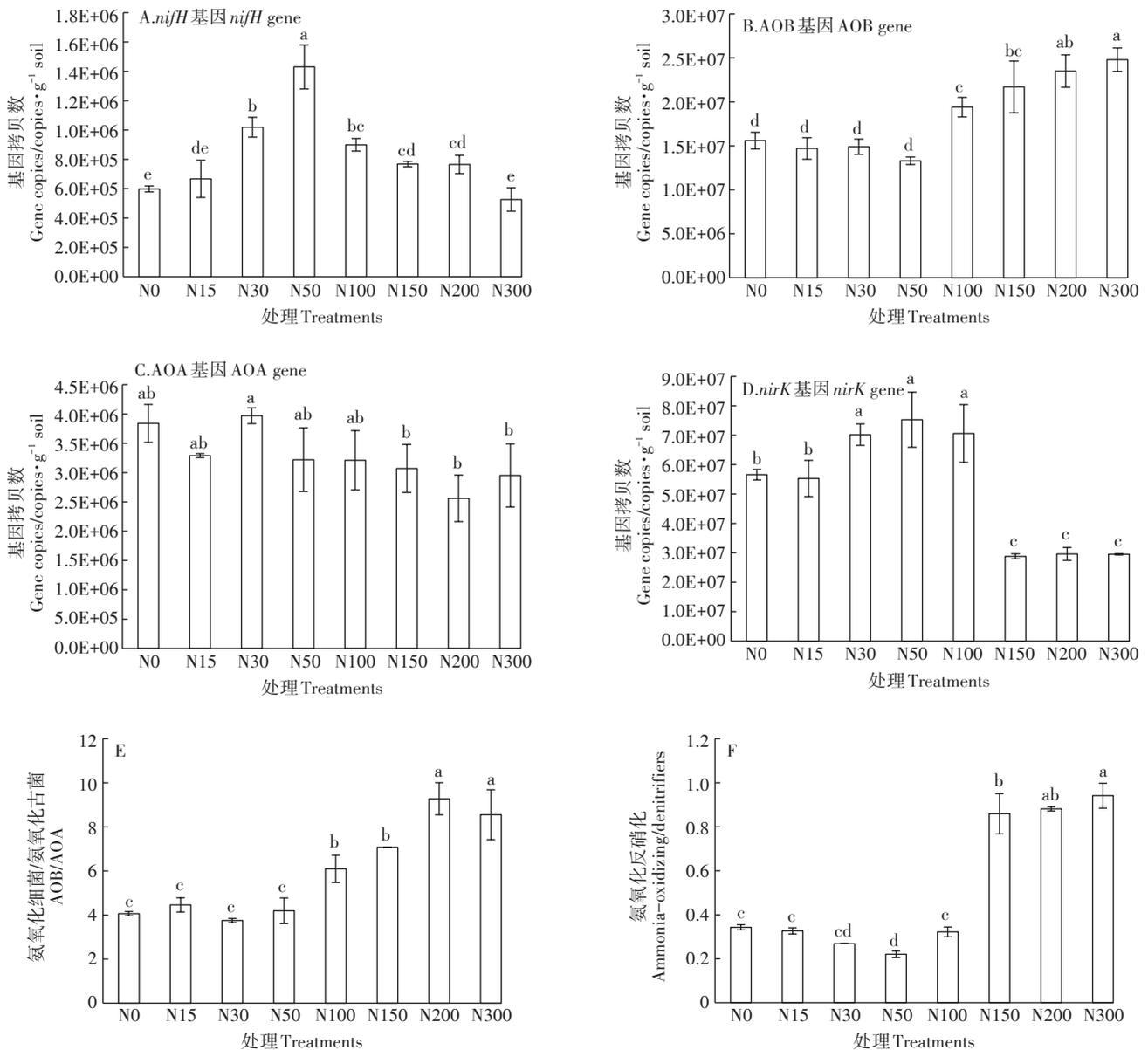


图1 不同氮处理的功能基因丰度

Figure 1 Functional genes in different nitrogen treatments

表3 功能基因拷贝数与化学性质之间的相关性分析

Table 3 Correlation analysis between functional gene copies and soil chemical properties

功能基因 Functional gene	pH	有机碳 Total organic C	全氮 Total N	硝态氮 NO ₃ -N	铵态氮 NH ₄ -N	可溶性有机氮 Soluble organic N	微生物生物量氮 Microbial biomass N
<i>nifH</i> 基因 <i>nifH</i> gene	0.227	-0.459*	0.042	-0.444*	0.750**	-0.306	-0.465*
氨氧化细菌 AOB- <i>amoA</i>	-0.833**	0.770**	0.351	0.911**	-0.222	0.680**	0.915**
氨氧化古菌 AOA- <i>amoA</i>	0.661**	-0.417*	0.347	-0.569**	0.000	-0.162	-0.519**
反硝化细菌 <i>nirK</i>	0.662**	-0.672**	0.010	-0.847**	0.618**	-0.430*	-0.766**
氨氧化细菌/氨氧化古菌 AOB/AOA	-0.880**	0.716**	-0.004	0.905**	-0.189	0.555**	0.874**
氨氧化微生物/反硝化微生物 ammonia-oxidizing/denitrifiers	-0.812**	0.785**	0.173	0.957**	-0.428*	0.605**	0.899**

注:*表示显著相关($P<0.05$),**表示极显著相关($P<0.01$)。

Note:*indicated significant correlation ($P<0.05$),**indicated highly significant correlation ($P<0.01$).

(N150、N200和N300)*nirK*基因丰度显著低于对照N0 ($P<0.05$),显著提高了氨氧化/反硝化丰度比值(图1F)。

2.3 土壤氮素转化功能基因丰度与土壤因子的相关性

土壤氮转化功能基因拷贝数与土壤化学性质相关性分析见表3。土壤*nifH*基因拷贝数与总有机碳、硝态氮和微生物生物量氮含量呈显著负相关($P<0.05$),与土壤铵态氮含量呈极显著正相关($P<0.01$)。土壤AOB-*amoA*基因拷贝数与有机碳、硝态氮、可溶性有机氮和微生物生物量氮含量呈极显著正相关($P<0.01$),与土壤pH呈极显著负相关($P<0.01$)。土壤AOA-*amoA*基因拷贝数与土壤pH呈极显著正相关($P<0.01$),与土壤有机碳、硝态氮和微生物生物量氮含量呈显著负相关($P<0.05$)。土壤*nirK*基因拷贝数与土壤pH和铵态氮含量呈极显著正相关关系($P<0.01$),与土壤有机碳、硝态氮、可溶性有机氮和微生物生物量氮含量呈显著负相关关系($P<0.05$)。AOB/AOA与土壤有机碳、硝态氮、可溶性有机氮和微生物生物量氮呈极显著正相关($P<0.01$),与pH呈极显著负相关($P<0.01$)。氨氧化/反硝化与土壤有机碳、硝态氮、可溶性有机氮和微生物生物量氮呈极显著正相关($P<0.01$),与pH和铵态氮含量呈显著负相关($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 土壤固氮功能基因对氮沉降响应的综合分析

土壤固氮微生物是一类重要的氮转化功能微生物,其能够将空气中的氮还原成氨供给植物吸收利用。固氮微生物数量与输入土壤的外源氮素密切相关,施氮量过高会降低固氮菌的丰度并抑制固氮酶的活性,并对固氮菌群落组成产生显著影响^[26]。本研究中,随着氮添加水平的升高,*nifH*丰度表现为先升高后降低趋势,N300处理降低了*nifH*基因相对丰度,其

他6个氮添加处理均高于或显著高于对照N0。即低于200 kg N·hm⁻²·a⁻¹时更有利于固氮菌的生长,而高于300 kg N·hm⁻²·a⁻¹时反而抑制其生长。这与刘彩霞等^[27]得出的氮沉降(铵态氮)高于60 kg N·hm⁻²·a⁻¹抑制杉木林固氮功能微生物生长结论一致。Zhang等^[7]研究也表明,高浓度无机氮添加抑制固氮菌生长。前人研究认为,氮肥输入降低固氮菌的丰度是由于土壤酸化或高氮含量造成的^[28]。

土壤固氮菌丰度与土壤有机碳含量、pH、有效磷含量等其他化学因子密切相关。本研究相关分析表明,*nifH*基因丰度与土壤有机碳含量呈显著负相关性。由于生物固氮过程需要消耗大量能量,而该过程在很大程度上依赖于土壤中的有机碳含量。高氮添加虽然提高了土壤有机碳含量,但高氮添加导致高的速效氮含量反而会抑制土壤的生物固氮过程。本研究表明,*nifH*基因丰度与铵态氮含量呈极显著正相关,与土壤硝态氮含量呈显著负相关。表明氮添加量增加引起土壤可利用性氮含量变化是引起固氮功能基因丰度发生变化的重要驱动因素。Wang等^[29]研究表明,长期施肥引起小麦生长季土壤铵态氮含量改变,显著影响固氮菌丰度,不利于土壤微生物的固氮功能。本研究中,低氮添加促进土壤的生物固氮过程,但过高氮添加反而会抑制土壤的生物固氮过程。表明未来连续高氮沉降可能不利于贝加尔针茅草原土壤微生物的固氮功能。

3.2 土壤氨氧化功能基因对氮沉降响应的综合分析

硝化作用是氮素转化的关键过程,由含氮单加氧酶基因(*amoA*)、氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)共同驱动氨氧化过程是硝化作用的限速步骤,其数量和结构组成变化可反映土壤氮素变化^[30]。目前氮肥或氮添加对土壤硝化作用的影响研究大多是

针对这一步骤开展的。一般情况下,氨是微生物进行硝化作用的直接底物,酸性土壤中铵根离子分解处理的氨较少,从而抑制 AOB 生长^[31]。本研究,低氮添加(N15、N30 和 N50)对氨氧化细菌 AOB 相对丰度无显著影响,而高氮添加显著提高了氨氧化细菌丰度。说明连续 6 a 高氮添加,促进了 AOB 的生长繁殖。这与 Li 等^[32]对内蒙古草原 10 a 氮添加试验 AOB 基因丰度变化结果一致。Ai 等^[33]在对小麦玉米轮作潮土研究表明,氮肥添加可显著提高 AOB 的数量。其可能原因是土壤中存在对 NH_4^+ 有较高亲和力的未知的 AOB^[34]或者是某些 AOB 的生长不以 NH_4^+ 作为唯一底物^[35]。与 AOB 丰度变化情况不同,除 N30 处理与对照相比无显著差异外,其余 6 种氮添加处理均降低了土壤氨氧化古菌基因丰度,说明长期氮沉降增加会导致土壤氨氧化古菌丰度降低。长期施氮肥导致南方红壤中氨氧化古菌丰度降低^[36],这表明尽管草原暗栗钙土和南方红壤在 pH、有机质和碳氮水平上存在较大差异,但长期氮添加和长期施用氮肥对这两种土壤中氨氧化古菌的影响存在一致性。在本研究中,各氮添加处理土壤 AOB-*amoA* 基因拷贝数比 AOA-*amoA* 基因拷贝数高一个数量级,可见本试验环境下更有利于 AOB 生长。这与 Yao 等^[37]在茶园酸性土壤 AOA 主导氨氧化作用的研究结果不一致。前人研究表明,AOB 和 AOA 生长对土壤含氮量响应不同,AOB 对高氮环境较为适应,而 AOA 倾向于低氮环境^[38]。本试验中高氮添加处理土壤硝态氮含量显著高于低氮添加和对照处理,从而促进了 AOB 生长。但对于这一原因推测的合理性还需要进一步深入研究。

大量研究表明,多种土壤环境因子,包括 pH、温度、土壤类型和利用方式等都会影响氨氧化微生物的群落组成和数量,从而使氮添加对土壤氨氧化微生物影响存在很大不确定性。本研究氨氧化细菌和氨氧化古菌与土壤理化因子的相关分析表明,影响氨氧化功能基因相对丰度的土壤理化因子为 pH、有机碳、硝态氮和微生物生物量氮含量。这与 Hayden 等^[39]对澳大利亚农业与草地氮转化功能基因驱动因子研究结果一致。相关分析表明,AOB 基因拷贝数与土壤有机碳含量呈极显著正相关,说明连续 6 a 氮添加提高了贝加尔针茅草原土壤有机碳含量是促进氨氧化细菌生长繁殖的重要因素。一些研究表明,氨氧化细菌适合在氮素含量丰富的土壤中生存,且其数量与土壤 pH 呈显著负相关^[14,40]。本研究中,氨氧化细菌基因拷贝数与土壤 pH 呈极显著负相关。这与其研究结果一

致。原因可能是,随着氮添加水平的提高,土壤 pH 降低,使得土壤中耐酸性 AOB 数量增多^[41]。氨氧化古菌与土壤化学因子的相关性分析表明,氨氧化古菌基因拷贝数与土壤 pH 呈极显著正相关,说明贝加尔针茅草原土壤中 AOA 基因丰度随着 pH 降低而显著降低。高氮添加增加了土壤中硝态氮含量,相应的 AOB 基因拷贝数增加,而 AOA 基因拷贝数则减少,AOB/AOA 比值提高,且随着氮添加水平的提高,提高的幅度明显增加。表明连续 6 a 高氮添加,改变了氨氧化微生物相对丰度,氨氧化微生物对氨氧化的相对贡献也可能发生改变。但氨氧化微生物对氨氧化作用的相对贡献率是否发生改变,还需采用同位素示踪技术进一步研究。相关分析表明,AOA 基因拷贝数与土壤硝态氮含量呈极显著负相关关系,这与 Di 等^[38]的 AOA 适合于低氮环境的研究结论一致。本研究中长期连续氮添加导致的土壤化学性质变化,尤其是土壤 pH 降低导致土壤中 AOA 丰度明显降低,可能降低土壤中 AOA 的氨氧化功能,进一步影响贝加尔针茅草原土壤的硝化作用。

3.3 土壤反硝化功能基因对氮沉降响应的综合分析

反硝化作用是将硝酸根还原为 N_2O 或 N_2 的过程,是由许多厌氧或兼性厌氧微生物参与的一系列酶催化过程。这些酶主要由功能基因硝酸还原酶 *narG/napA*、亚硝酸还原酶 *nirK/nirS*、一氧化氮还原酶 *norB* 和氧化亚氮还原酶 *nosZ* 编码。不同反硝化功能基因型对环境因子的影响存在较大差异。其中,亚硝酸还原酶 *nirK/nirS* 催化亚硝酸盐还原成 NO 是微生物驱动反硝化作用关键步骤。已有研究表明,*nirK* 型反硝化细菌对施肥种类和施肥量都十分敏感^[42]。连续 6 a 氮添加显著影响了 *nirK* 相对丰度,N30、N50 和 N100 处理显著提高了 *nirK* 相对丰度,N150、N200 和 N300 处理显著降低了 *nirK* 相对丰度。表明,高氮添加(N150、N200 和 N300)对 *nirK* 丰度有明显的抑制作用。

环境因子如土壤 pH、温度、有机碳、硝态氮含量是影响反硝化作用的重要因素。本研究相关分析表明,*nirK* 相对丰度与土壤 pH、有机碳、硝态氮、铵态氮、可溶性有机氮和微生物生物量氮含量均呈显著相关性(表 3)。Xie 等^[43]研究认为土壤有机碳和硝酸盐含量是驱动青藏高原草甸反硝化功能基因 *nirK* 丰度的重要土壤因子。Jahangir 等^[44]研究表明,反硝化活性的高低与提供给细菌生长的有机质的质量和数量密切相关。土壤反硝化作用最适 pH 范围为 7.0~8.0,在此范围内反硝化作用最好^[45]。在本研究中,高氮添加

(N150、N200和N300)处理pH显著低于对照N0,降低了土壤pH,抑制了反硝化功能基因*nirK*丰度,并由此可能对反硝化作用产生影响。一般情况下,土壤AOB基因丰度增加会提高反硝化作物的底物硝酸盐含量,进而促进反硝化微生物驱动的反硝化作用,造成氮素流失。但本研究中,高氮(N150、N200和N300)显著降低了反硝化细菌*nirK*基因丰度,而硝态氮含量却显著提高。说明高氮添加驱动的反硝化作用高于驱动的反硝化的土壤的反硝化作用。土壤*nirK*基因丰度与土壤硝态氮含量呈极显著负相关验证了这一观点。

上述研究表明,贝加尔针茅草原土壤反硝化活性受土壤化学性质特别是pH、有机碳、硝态氮、铵态氮、可溶性有机氮和微生物生物量氮含量的显著影响。此外,由于不同反硝化过程所涉及的酶不同,同时携带不同反硝化基因的微生物种群对环境因子响应的差异,因此,揭示不同氮添加水平对反硝化功能微生物基因丰度的影响,需要对不同类型的反硝化微生物开展深入研究。

4 结论

(1)随着氮添加水平的增加,固氮细菌*nifH*基因丰度呈现先升高后降低趋势。低于 $200 \text{ kg N} \cdot \text{hm}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$ 时促进固氮菌生长。影响固氮菌*nifH*主要环境因子是土壤有机碳、铵态氮、硝态氮和微生物生物量氮含量。

(2)高氮添加(N100、N150、N200和N300)提高了AOB基因丰度,降低了AOA基因丰度,并显著提高了AOB/AOA,表明氮添加量增加可能使AOB在贝加尔针茅草原土壤硝化过程中占主导作用。影响AOB、AOA基因丰度的主要环境因子是土壤pH、有机碳、硝态氮和微生物生物量氮含量。

(3)高氮添加(N150、N200和N300)降低了反硝化细菌*nirK*基因丰度。氮添加量的增加促进了AOB主导的氨氧化过程,而反硝化微生物*nirK*丰度的降低提高了氨氧化产物的积累,继而提高了土壤中的硝态氮含量。影响反硝化细菌*nirK*的主要环境因子是土壤pH、有机碳、硝态氮、铵态氮、可溶性有机氮和微生物生物量氮含量。

参考文献:

[1] Liu L, Zhang T, Gilliam F S, et al. Interactive effects of nitrogen and phosphorus on soil microbial communities in a tropical forest[J]. *PLoS*

One, 2013, 8(4):e61188.

- [2] Eisenlord S D, Freedman Z, Zak D R, et al. Microbial mechanisms mediating increased soil C storage under elevated atmospheric N deposition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79:1191-1199.
- [3] Bai Y F, Wu J G, Clark C M, et al. Tradeoffs and thresholds in the effects of nitrogen addition on biodiversity and ecosystem functioning: Evidence from Inner Mongolia grasslands[J]. *Global Change Biology*, 2010, 16(1):358-372.
- [4] Hasselquist N J, Hogberg P. Dosage and duration effects of nitrogen additions on ectomycorrhizal sporocarp production and functioning: An example from two N-limited boreal forests[J]. *Ecology and Evolution*, 2014, 4(15):3015-3026.
- [5] BassiriRad H. Consequences of atmospheric nitrogen deposition in terrestrial ecosystems, old questions, new perspectives[J]. *Oecologia*, 2015, 177(1):1-3.
- [6] 杨涵越, 张婷, 黄永梅, 等. 模拟氮沉降对内蒙古克氏针茅草原 N_2O 排放的影响[J]. *环境科学*, 2016, 37(5):1900-1907.
- YANG Han-yue, ZHANG Ting, HUANG Yong-mei, et al. Effect of stimulated N deposition on N_2O emission from a *Stipa krylovii* Steppe in Inner Mongolia, China[J]. *Environmental Science*, 2016, 37(5):1900-1907.
- [7] Zhang X M, Han X G. Nitrogen deposition alters soil chemical properties and bacterial communities in the Inner Mongolia grassland[J]. *Journal of Environmental Science*, 2012, 24(8):1483-1491.
- [8] Jorquera M A, Martinez O A, Marileo L G, et al. Effects of nitrogen and phosphorus fertilization on the composition of rhizobacterial communities of two Chilean Andisol pastures[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(1):99-107.
- [9] Orr C H, Leifert C, Cummings S P, et al. Impacts of organic and conventional crop management on diversity and activity of free-living nitrogen fixing bacteria and total bacteria are subsidiary to temporal effects[J]. *PLoS One*, 2012, 7:483-496.
- [10] Zhang X M, Liu W, Schloter M, et al. Response of the abundance of key soil microbial nitrogen-cycling genes to multi-factorial global changes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):e76500.
- [11] Ning Q S, Gu Q, Shen J P, et al. Effects of nitrogen deposition rates and frequencies on the abundance of soil nitrogen-related functional genes in temperate grassland of northern China[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2015, 15(3):694-704.
- [12] Shen X Y, Zhang L M, Shen J P, et al. Nitrogen loading levels affect abundance and composition of soil ammonia oxidizing prokaryotes in semiarid temperate grassland[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2011, 11(7):1243-1252.
- [13] Zhou J, Guan D W, Zhou B K, et al. Influence of 34-years of fertilization on bacterial communities in an intensively cultivated black soil in northeast China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 90:42-51.
- [14] Wang C H, Zhu F, Zhao X, et al. The effects of N and P additions on microbial N transformations and biomass on saline-alkaline grassland of loess plateau of northern China[J]. *Geoderma*, 2014, 213(1):419-425.
- [15] Wang J, Bao J T, Su J Q, et al. Impact of inorganic nitrogen additions

- on microbes in biological soil crusts[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 88:303-313.
- [16] 刘红梅, 张海芳, 皇甫超河, 等. 长期氮添加对贝加尔针茅草原土壤微生物群落多样性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2017, 36(4): 709-717.
- LIU Hong-mei, ZHANG Hai-fang, HUANGFU Chao-he, et al. Effects of different long-term nitrogen addition on soil microbial diversity of *Stipa baicalensis* steppe in Inner Mongolia, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(4): 709-717.
- [17] 莫江明, 薛璟花, 方运霆. 鼎湖山主要森林植物凋落物分解及其对N沉降的响应[J]. *生态学报*, 2004, 24(7): 1413-1420.
- MO Jiang-ming, XUE Jing-hua, FANG Yun-ting. Litter decomposition and its responses to simulated N deposition for the major plants of Dinghushan forests in subtropical China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(7): 1413-1420.
- [18] Clark C M, Cleland E E, Collins S L, et al. Environmental and plant community determinants of species loss following nitrogen enrichment [J]. *Ecology Letters*, 2007, 10(7): 596-607.
- [19] 鲍士旦. 土壤农化分析[M], 第三版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- BAO Shi-dan. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. Third Edition. Beijing: China Agricultural Press, 2000.
- [20] 吴金水, 林启美, 黄巧云, 等. 土壤微生物生物量测定方法及其应用[M]. 北京: 气象出版社, 2006.
- WU Jin-shui, LIN Qi-mei, HUANG Qiao-yun, et al. Determination of soil microbial biomass and its application[M]. Beijing: China Meteorological Press, 2006.
- [21] 倪银霞, 黄懿梅, 牛丹, 等. 宁南山区林地土壤原位矿化过程中碳氮转化耦合特征[J]. *环境科学*, 2015, 36(9): 3401-3410.
- NI Yin-xia, HUANG Yi-mei, NIU Dan, et al. Characteristics and coupling relationship of soil carbon and nitrogen transformation during in-situ mineralization cultivation in forestlands in the mountain area of southern Ningxia[J]. *Environmental Science*, 2015, 36(9): 3401-3410.
- [22] Rösch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3818-3829.
- [23] Rothauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4704-4712.
- [24] 梁龙, 梁小兵. 氨氧化细菌和氨氧化古菌在百花湖沉积物中的垂直分布[J]. *矿物岩石地球化学通报*, 2014, 33(2): 221-225.
- LIANG Long, LIANG Xiao-bing. Vertical distribution of ammonia oxidizing bacteria (AOB) and ammonia oxidizing archaea in the sediments of lake Baihua[J]. *Geochemical Report of Minerals and Rocks*, 2014, 33(2): 221-225.
- [25] Bremer C, Braker G, Matthies D, et al. Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of *nirK*-type denitrifier communities in soil[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2007, 73(21): 6876-6884.
- [26] Reardon C L, Gollany H T, Wuest S B. Diazotroph community structure and abundance in wheat-fallow and wheat-pea crop rotations[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 69: 406-412.
- [27] 刘彩霞, 焦如珍, 董玉红, 等. 模拟氮沉降对杉木林土壤氮循环相关微生物的影响[J]. *林业科学*, 2015, 51(4): 96-102.
- LIU Cai-xia, JIAO Ru-zhen, DONG Yu-hong, et al. Response of the N-Cycling associated soil microorganism to simulated N deposition in a plantation of *Cunninghamia lanceolata*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51(4): 96-102.
- [28] Wang C, Zheng M M, Song W F, et al. Impact of 25 years of inorganic fertilization on diazotrophic abundance and community structure in an acidic soil in southern China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 113: 240-249.
- [29] Wang J C, Zhang D, Zhang L, et al. Temporal variation of diazotrophic community abundance and structure in surface and subsoil under four fertilization regimes during a wheat growing season[J]. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 2016, 216: 116-124.
- [30] Li S, Shakoor A, Wubet T, et al. Fine-scale variations of fungal community in a heterogeneous grassland in Inner Mongolia: Effects of the plant community and edaphic parameters[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 122: 104-110.
- [31] Xia W, Zhang C, Zeng X, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(7): 1226.
- [32] Li X X, Ying J Y, Chen Y, et al. Effects of nitrogen addition on the abundance and composition of soil ammonia oxidizers in Inner Mongolia grassland[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(31): 174-178.
- [33] Ai C, Liang G Q, Sun J W, et al. Different roles of rhizosphere effect and long-term fertilization in the activity and community structure of ammonia oxidizers in a calcareous fluvo-aquic soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 57: 30-42.
- [34] Yao H, 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.
- [35] Tago K, Okubo T, Shimomura Y, et al. Environmental factors shaping the community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in sugarcane field soil[J]. *Microbes and Environments*, 2015, 30(1): 21-28.
- [36] 张苗苗, 王伯仁, 李冬初, 等. 长期施加氮肥及氧化钙调节对酸性土壤硝化作用及氨氧化微生物的影响[J]. *生态学报*, 2015, 35(19): 6362-6370.
- ZHANG Miao-miao, WANG Bo-ren, LI Dong-chu, et al. Effects of long-term N fertilizer application and liming on nitrification and ammonia oxidizers in acidic soils[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(19): 6362-6370.
- [37] 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.
- [38] Di H J, Cameron K C, Shen J P, et al. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72: 386-394.
- [39] Hayden H L, Drake J, Imhof M, et al. The abundance of nitrogen cy-

- cle genes *amoA* and *nirH* depends on land-uses and soil types in South-Eastern Australia[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2010, 42(10):1774-1783.
- [40] 杨亚东, 张明才, 胡君蔚, 等. 施氮肥对华北平原土壤氨氧化细菌和古菌数量及群落结构的影响[J]. 生态学报, 2017, 37(11):3636-3646.
- YANG Ya-dong, ZHANG Ming-cai, HU Jun-wei, et al. Effects of nitrogen fertilizer application on abundance and community structure of ammonia oxidizing bacteria and archaea in a North China agricultural soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(11):3636-3646.
- [41] 任灵玲, 李秀玲, 刘灵芝. 不同施肥方式下土壤氨氧化细菌的群落特征[J]. 中国生态农业学报, 2019, 27(1):11-19.
- REN Ling-ling, LI Xiu-ling, LIU Ling-zhi. Community characteristics of soil ammonia oxidizing bacteria after different fertilizer applications[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2019, 27(1):11-19.
- [42] Yin C, Fan F L, Song A L, Li Z, et al. Different denitrification potential of aquatic brown soil in Northeast China under inorganic and organic fertilization accompanied by distinct changes of *nirS*- and *nirK*-denitrifying bacterial community[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2014, 65:47-56.
- [43] Xie Z, Roux X L, Wang C P, et al. Identifying response groups of soil nitrifiers and denitrifiers to grazing and associated soil environmental drivers in Tibetan alpine meadows[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 77(7):89-99.
- [44] Jahangir M M R, Khalil M I, Johnston P, et al. Denitrification potential in subsoils: A mechanism to reduce nitrate leaching to groundwater[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2012, 147:13-23.
- [45] 刘秋丽, 马娟娟, 孙西欢, 等. 土壤的硝化-反硝化作用因素研究进展[J]. 农业工程, 2011, 1(4):79-83, 13.
- LIU Qiu-li, MA Juan-juan, SUN Xi-huan, et al. Research advancement on soil nitrification-denitrification and its influencing factors[J]. *Agricultural Engineering*, 2011, 1(4):79-83, 13.