・热带作物・

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswxb.20230128



主持人:徐 冉 张洪亮

酸性稻田全程氨氧化菌对氮肥施加的响应

付亚军1,高文龙2,3,陈 淼2,3

(1.海南大学 生态与环境学院,海口 570228; 2.中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所,海口 571101;3.海南儋州热带农业生态系统国家野外科学观测研究站,海南 儋州 571737)

摘 要:为了揭示酸性稻田全程、半程氨氧化菌对增氮的响应与敏感性差异,通过盆栽实验,设置施加氮肥处理,测定分蘖期、抽穗期、成熟期全程及半程氨氧化菌的丰度,比较全程、半程氨氧化菌对施肥的响应敏感性。结果表明:未施肥与施肥情形下,分蘖期、抽穗期、成熟期土壤氨氧化菌的优势种群均为全程氨氧化菌(Clade A: 3.24×10⁸~7.24×10⁸ copies·g⁻¹, Clade B: 2.14×10⁸~1.48×10⁹ copies·g⁻¹)而非半程氨氧化菌(AOA: 2.00×10⁷~4.37×10⁷ copies·g⁻¹, AOB: 1.35×10⁷~3.31×10⁷ copies·g⁻¹)。施肥的主效应(Clade A: P = 0.762, Clade B: 氮素利用率 = 0.398)、生育期的主效应(Clade A: P = 0.264, Clade B: P = 0.237)、施肥与生育期的交互效应(Clade A: P = 0.316, Clade B: P = 0.294)均不显著,即全程氨氧化菌两大分支A和B季节变化并不显著,二者对尿素施加的响应并不敏感。未施氮肥与施加氮肥的情形下全程氨氧化菌丰度的环境调控因子可能有所不同。未施氮肥情形下,全程氨氧化菌的2个分支A(Clade A: R = -0.73, P = 0.027)和B(Clade B: R = -0.75, P = 0.019)的丰度均与土壤总氮含量呈负相关,预示着无外源性氮输入情形下,全程氦氧化菌的生长受土壤有机氮、氨化作用和游离氨负向调控。施加氮肥情形下,全程氦氧化菌尤其是分支A的丰度可能更多地受土壤pH、氧化还原电位(Eh)及NH₄⁴-N含量的影响。氮肥的施加显著影响全程、半程氨氧化菌的群落共变性,致使Clade B 丰度与AOA、AOB 丰度的正向共变趋势消失。

关键词:全程氨氧化菌;半程氨氧化菌;尿素添加;生育期;酸性稻田

中图分类号: S511 文献标志码: A 文章编号: 1674-7054 (2024) 05-0509-11

付亚军,高文龙,陈淼.酸性稻田全程氨氧化菌对氮肥施加的响应 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(5):509-519. doi: 10.15886/j.enki.rdswxb.20230128

氨(NH₃)生物氧化为硝酸盐的过程是氮(N)循 环的中心环节。在过去相当一段时间内,普遍认 为,硝化作用是由进化关系并非近缘的氨氧化微 生物如氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)、氨氧化古菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)、氨氧化古菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)和亚硝酸氮氧化细菌(nitrite-oxidizing bacteria, NOB)分步接力完成的^[1]。直至2015年,这一 传承百年的两步硝化理论才受到质疑,原因在于 "单步硝化作用"的发现^[2-3]。研究证实,隶属于 NOB 的硝化螺菌属的部分菌群,如 Candidatus *Nitrospira* inopinata、Candidatus *Nitrospira* nitrosa 和 Candidatus *Nitrospira* nitrificans 的基因组含有编码 氨单加氧酶(ammonium monooxygenase, AMO)、羟 胺脱氢酶(hydroxylamine oxidoreductase, HAO)和亚 硝酸氧化还原酶(nitrite oxidoreductase, NXR)的全 套基因,这类具备独自完成氨氧化、亚硝酸盐氧化 能力的微生物统称全程氨氧化菌(Comammox *Nitrospira*)^[2-3]。全程氨氧化菌并非栖息在边缘地 带的稀有物种,广泛分布于自然生境和人工工程 系统^[4],如森林土壤^[5]、农业生态系统^[6]、淡水环 境^[7]、污水处理厂和自来水厂^[6,8]。目前,已发现的 可培养的和不可培养的Comammox *Nitrospira* 均属

收稿日期: 2023-11-28 修回日期: 2024-02-25

基金项目:海南省重点研发计划项目(ZDYF2021XDNY280);广东省基础与应用基础研究基金项目(2022A1515010804); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项(1630042022001)

第一作者: 付亚军(1998-),男,海南大学生态与环境学院 2021 级硕士研究生。E-mail: f1056603026@163.com

通信作者: 陈淼(1985-),男,博士,副研究员。 研究方向:农田土壤碳氮循环。E-mail: cataseppiael@163.com

于硝化螺菌谱系Ⅱ,包含Clade A和Clade B^[9]。显 然,全程氨氧化作用与全程氨氧化菌的发现,丰富 了硝化作用的理论体系,也引出了一系列亟待解 决的科学问题。全程氨氧化菌在土壤生态系统的 分布规律与环境偏好是什么? 寡营养、富营养土 壤环境全程氨氧化菌的适应机制与调控因子有何 差异?相比半程氨氧化菌(如AOA、AOB),全程氨 氧化菌是否对施肥的响应更为敏感?这些问题均 需深入研究。尽管全程、半程氨氧化菌的生长与 分布均受环境因素如pH、氧化还原电位(Eh)、水 分、氨氮、硝氮、土壤有机碳等强烈调控[10-11],但二 者的环境偏好不同。不同于半程氨氧化菌AOA偏 好生长于酸性贫营养的环境^[12],AOB在偏碱性富 营养的环境具有竞争优势[13],全程氨氧化菌可能 喜爱微碱性的环境[14]。研究发现:(1)全程氨氧化 菌的耐酸性甚至高于 AOA, 在酸性土壤中其丰度 随着pH降低而增加^[5,15];(2)与半程氨氧化菌相 比,全程氨氧化菌在含水量高、贫氮低氧的环境中 更具竞争优势[10,12,16]。当前对全程氨氧化菌环境 分布的研究主要集中在森林、草地、湿地、水库等 非农业生态系统[5.14.17],而与人类的生产生活息息 相关的农业土壤研究甚少[18-19]。农业土壤具有人 为投入的肥料用量高的特点。相比非农业土壤, 栖息于农业土壤的全程氨氧化菌的生理特性应该 有显著不同,对氮肥的耐受性可能更强。尽管有 大量研究揭示了氮肥施加对农业土壤中的半程氨 氧化菌AOA、AOB的影响^[20-21],遗憾的是鲜有研究 揭示农业土壤全程氨氧化菌对外加氮肥的响应与 敏感性[22]。近年来研究表明,全程氨氧化菌 Comammox Nitrospira 的分布似乎并不局限于寡营 养的环境^[18],且Comammox Nitrospira的分支Clade A和 Clade B对氨的亲和力不同, Clade B相比 Clade A更适应于寡营养的环境^[10]。由此衍生的一 个关键科学问题:在农业土壤中相比Clade A, Clade B是否对氮肥施加的响应更为敏感?

水稻(Oryza sativa)是我国最重要的粮食作物 之一,稻田土壤是一种特殊人为土类,其氨氧化微 生物多样性较高,Comammox Nitrospira 与 AOA、 AOB 往往同步出现^[6,14],为研究全程、半程氨氧化 微生物的生态位分化规律提供了必要的前提条 件。水稻不同生育期,土壤无机氮、氧气、pH、氧化 还原电位(Eh)等会发生剧烈变化^[23],而这些可能 是驱动氨氧化微生物群落演替的关键动力^[5,24]。因此,有必要绘制不同生育期水稻土氨氧化微生物的全景图,揭示生育期对水稻土全程氨氧化菌的影响,探明生育期与氮肥施加的交互效应。已有的相关研究主要在非酸性稻田^[25-26],较少关注酸性稻田^[27],对酸性稻田全程氨氧化菌生理特性、生存策略和氮肥耐受性的了解匮乏。因此,迫切需要开展研究工作来揭示酸性稻田全程、半程氨氧化菌对增氮的响应与敏感性差异,从而为酸性稻田硝化过程、硝化功能微生物定向调控提供更加精细化的指导。

本研究选取酸性水稻土,设置氮肥添加处理, 开展水稻盆栽试验,利用实时荧光定量 PCR (qPCR)技术量化水稻不同生育期(分蘖期、抽穗期 和成熟期)、不同氮肥处理(对照、施氮)全程、半程 氨氧化菌丰度,同步监测土壤碳氮、pH、铵态氮 (NH₄⁺-N)、硝态氮(NO₃⁻-N)和氧化还原电位(Eh)等 理化性质,重点关注酸性稻田土壤中全程氨氧化 菌对氮肥的耐受性,旨在揭示酸性稻田全程、半程 氨氧化菌的增氮响应敏感性差异。

1 材料与方法

1.1 试验材料与设计 水稻盆栽试验于海南省海 口市中国热带农业科学院环境与植物保护研究 (19.59°N,110.20°E)所进行。水稻盆栽供试土壤 采自海南省儋州市大成镇新营村(109.28°E, 19.29°N,2023年7月采集)长年种植水稻的农田, 供试水稻品种为籼型杂交水稻种'特优458'(琼审 稻2010015)。由于水稻根系的80%以上分布在表 层 0~10 cm 土壤, 故采集 0~10 cm 耕作层土壤作为 水稻盆栽土,取土时刮去表层0~3 cm土壤,以尽量 避免地表土壤理化性质变异性大等问题。供试土 壤自然风干,过2mm筛,并去除可见石砾、残根。 过筛土壤分为2部分,一部分用于土壤理化性质的 测定,一部分用于水稻盆栽试验。供试土壤基本理 化性质如下:pH4.9,NH⁺-N含量34.61 mg·kg⁻¹,NO₃⁻-N含量9.70 mg·kg⁻¹,土壤有机碳(SOC)含量33.03 g·kg⁻¹, 全氮(TN)含量2.75 g·kg⁻¹。

水稻盆栽试验参照Nie等^[28]的方法,结合本研究 供试土壤理化性质做适当调整。本研究盆栽试验设 置两组处理:不施加氮的对照组和外施氮肥组[尿素 CO(NH₂)₂;N120 mg·kg⁻¹,干土]。土壤装入盆前,一 次性加入氮肥并混匀,同时加入 $NaH_2PO_4(P 30 mg \cdot kg^{-1},$ 干土)和KCl(K 160 mg·kg⁻¹,干土)作为基肥。随后将 两组与肥料混合均匀的土壤分装至种植盆(直径 17.2 cm, 高15 cm)。每盆装填的风干土质量2620g, 并在装土后加水浸泡一周,期间保持3 cm的淹水层。 选取大小一致、颗粒饱满的水稻种子,用30%(体积比) 的双氧水(H₂O₂)消毒10min,接着用去离子水反复清 洗5次后浸泡30h至水稻种子出芽露白。随后将露 白的种子置于育苗盘,经3周生长,选取长势良好的 水稻秧苗移栽至种植盆中。本试验设置2组氮肥处 理,并按不同生育期(分蘖期、抽穗期、成熟期)设置 重复,以进行采样观测,即在2组氮肥处理基础上,每 个生育期均设置重复,2组氮肥处理×3生育期×3重复, 共18个盆栽。试验过程中,所有盆栽均置于同一温 室内培养,期间监测气候因子(温度,湿度),全程保 持3 cm的淹水层,以更好地进行盆栽水管理,排除加 水量不同对土壤含水率等造成的干扰。

1.2 土壤样本的采集 在水稻的分蘖期、抽穗期和成熟期采集土壤样本。采样时,去除土壤样品中的可见植物组织,包括水稻植株、根系以及根际土壤,然后分别将各个盆栽内土壤充分混合均匀。 采集各种植盆内全部土壤,然后分为3份:1份于-20℃条件下保存,用于微生物分子实验;1份4℃条件下保存,用于测定土壤含水率、无机氮等;1份 风干、过筛、研磨,用于分析土壤有机碳(SOC)、全氮(TN)等土壤理化性质。

1.3 土壤理化性质的测定 土壤理化性质的测定 参照《土壤农化分析》^[29]。土壤pH和氧化还原电 位(Eh)采用FiveEasy Plus[™]pH计(梅特勒-托利多 上海有限公司)测定,土水比为1:2.5。土壤铵态氮 和硝态氮采用Bremner法;2 mol·L⁻¹ KCl作为浸提 液,NH₄+-N含量通过靛酚蓝比色法测定,NO₃-N含 量通过紫外分光光度法测定。土壤总氮(TN)采用 开氏法测定,土壤有机碳(SOC)采用重铬酸钾容量 法测定。

1.4 土壤 DNA 提取和实时荧光定量 PCR 采用 Fast DNA Spin Kit for Soil 试剂盒提供的方法提取 土壤样品的 DNA,然后经 Nanodrop 2000 测定浓度 及纯度。基于氨单加氧酶基因(*amoA*),利用 2× ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (High ROX Premixed) R mix 定量 PCR 仪测定全程氨氧化菌 (Comammox-Clade A、Comammox-Clade B)、半程氨 氧化菌(AOA、AOB)的丰度。qPCR 的扩增体系为 20 μ L体系,其中,前引物和后引物(10 μ mol·L⁻¹) 各 0.4 μ L,1.5 μ L DNA,7.7 μ L 灭菌水。每个样品 设置 3 个重复,并设置严格的阴性对照,根据标准 曲线计算基因拷贝数。荧光实时定量 PCR 所用的 引物信息及扩增反应体系见表1。

目标基因 Target gene	引物名 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	热循环 Thermal condition	参考文献 Reference
AOA-amoA	Arch-amoAF Arch-amoAR	STAATGGTCTGGCTTAGACG GCGGCCATCCATCTGTATGT	预变性:95°C,5min;	[30]
AOB-amoA	amoA-1F amoA-2R	GGGGTTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	45个循环: 变性温度95℃,15s; 温止温度55℃,20	[31]
Comammox Clade A-amoA	CA377f C576r	GTGGTGGTGGTCBAAYTA GAAGCCCATRTARTCNGCC	返火温度35 ℃,30 s; 延伸温度72 ℃,30 s; 溶解曲线:95.0 ℃,15 s;	[32]
Comammox Clade B-amoA	CB377f C576r	GTACTGGTGGGCBAAYTT GAAGCCCATRTARTCNGCC	65.0 °C,15 s;95.0 °C,15 s	[32]

表1 荧光定量 PCR 所用引物信息及热循环条件 Table 1 Design of primers and thermal cycle conditions for quantitative real-time

1.5 数据处理采用 IMB SPSS Statistics 23 进行统计分析。首先进行正态性检验,对符合正态性的数据进行重复测量方差分析(Repeated measures ANOVAs),满足方差齐次性采用最小显著性差异法(LSD)比较组间差异,不满足方差齐次性则采用 Tamhane's T2 法比较组间差异。对不符合

正态分布的数据进行非参数检验,通过 Kruskal-Wallis 检验对各组资料进行差异比较。同时,通过 Origin 2022 进行 Pearson 相关分析。数据结果 以平均值±标准误(Mean ± SE, n = 3)表示。P < 0.05表示具有显著差异,P < 0.01表示具有极显著 差异。

2 结果与分析

2.1 氮肥对全程氨氧化菌丰度的影响 方差分析 结果表明(表2),生育期对半程硝化微生物如AOA 的丰度(*P* = 0.030)有显著影响,而对全程氨氧化菌 Clade A(*P* = 0.264)、Clade B(*P* = 0.237)的丰度影响

不显著。与半程氨氧化菌 AOA(P = 0.762)、AOB (P = 0.769)类似,全程氨氧化菌 Clade A(P = 0.762)、Clade B(P = 0.398)对氮施加的响应不敏感。 生育期和施氮的交互效应对全程氨氧化菌 Clade A (P = 0.316)、Clade B(P = 0.294)、半程氨氧化菌 AOA (P = 0.289)、AOB(P = 0.188)丰度的影响均不显著。

表2 生育期和施氮对水稻土壤氨氧化菌丰度影响的重复测量方差分析

Table 2	Repeated measures analysis of variance tested for the effects of nitrogen application, growth stage, and the	eir
	interaction on ammonia oxidizing bacteria	

因子 Parameters	自由度 Degree of freedom	AOA AOA ab	AOA 丰度 AOA abundance		AOB 丰度 AOB abundance		Clade A 丰度 Clade A abundance		Clade B 丰度 Clade B abundance	
		F	Р	F	Р	F	Р	F	Р	
施氮 N addition	1	0.11	0.762	0.10	0.769	0.11	0.762	0.89	0.398	
生育期 Growth stage	2	10.16	0.030	2.89	0.114	1.58	0.264	1.73	0.237	
施氮×生育期 N addition × Growth stage	2	1.49	0.289	2.08	0.188	1.34	0.316	1.43	0.294	

由图1可知,未施加氮肥情形下,分蘖期、抽穗期、 成熟期土壤氨氧化微生物的优势菌群均为全程氨氧 化菌(Clade A:3.63×10⁸~7.24×10⁸ copies·g⁻¹,Clade B: 7.08×10⁸~1.48×10⁹ copies·g⁻¹),而非半程氨氧化菌 (AOA:2.00×10⁷~4.07×10⁷ copies·g⁻¹,AOB:1.55×10⁷~ 2.57×10⁷ copies·g⁻¹)。与半程氨氧化菌 AOA、AOB类 似,全程氨氧化菌 Clade A、Clade B的丰度无显著性 季节性变异。

施加氮肥的情形下,分蘖期、抽穗期、成熟期 氨氧化微生物的优势菌群同样均为全程氨氧化菌 (Clade A: $3.24 \times 10^8 \times 5.62 \times 10^8$ copies $\cdot g^{-1}$, Clade B: $2.14 \times 10^8 \times 1.05 \times 10^9$ copies $\cdot g^{-1}$),而非半程氨氧化菌 (AOA: $2.14 \times 10^7 \times 4.37 \times 10^7$ copies $\cdot g^{-1}$, AOB: $1.35 \times 10^7 \times 3.31 \times 10^7$ copies $\cdot g^{-1}$)。不同于半程氨氧化菌 AOA、AOB 与全程氨氧化菌分支A,全程氨氧化菌 Clade B的季节变异性不显著。

在分蘖期,与未施氮肥时相比(AOA:2.57× 10⁷ copies \cdot g⁻¹,AOB:2.09×10⁷ copies \cdot g⁻¹,Clade A:4.79× 10⁸ copies \cdot g⁻¹,Clade B:9.55×10⁸ copies \cdot g⁻¹),施加氮肥 的情形下全程氨氧化菌Clade A的丰度降低了 32.39% (*P* < 0.05),AOA、AOB及Clade B的丰度无显著性 变化。在抽穗期,与未施氮肥时相比(AOA:2.00× 10⁷ copies \cdot g⁻¹,AOB:1.55×10⁷ copies \cdot g⁻¹,Clade A:3.63× 10⁸ copies·g⁻¹, Clade B:7.08×10⁸ copies·g⁻¹), 全程氨氧 化菌 Clade A、Clade B与半程氨氧化菌 AOA、AOB的 丰度均未表现出显著差异。在成熟期, 与未施氮 肥时相比 (AOA: 4.07×10⁷ copies·g⁻¹, AOB: 2.57× 10⁷ copies·g⁻¹, Clade A:7.24×10⁸ copies·g⁻¹, Clade B: 1.48×10⁹ copies·g⁻¹), 施加氮肥的情形下全程氨氧化 菌 Clade A、Clade B与半程氨氧化菌 AOA、AOB的丰 度均未表现出显著差异。

2.2 全程氨氧化菌的调控因子及对增氮的响应 如表3所示,氮肥的施加对所测土壤理化因子的影 响均不显著;不同生育期土壤pH(P = 0.001)、 Eh(P < 0.001)、NH₄⁺-N(P = 0.001)、NO₃⁻-N(P = 0.003)存在显著差异;施氮和生育期的交互效应显 著影响了土壤Eh(P = 0.014)。

从图2可知,未施加氮肥情形下,土壤pH(5.8~5.0, P < 0.05)、Eh(83.00~124.00 mV,P < 0.05)、NH₄⁺⁻ N(69.55~20.29 mg·kg⁻¹,P < 0.05)、NO₃⁻-N(11.50~ 6.14 mg·kg⁻¹,P < 0.05)均呈现显著性的季节性变异。 其中,土壤pH、NH₄⁺⁻N呈现逐期降低的季节性变异趋势,Eh呈现为逐期升高的季节性变异趋势。TN、SOC 未表现出显著性的季节性变异。施加氮肥的情形下, 土壤pH(6.0~4.9,P < 0.05)、Eh(6.0~4.9 mV,P < 0.05)、 NH₄⁺⁻N(89.78~25.31 mg·kg⁻¹,P < 0.05)、NO₃⁻⁻N(89.78~





小写字母代表同一生育期不同施肥处理间的差异(P<0.05),大写字母代表相同施肥处理下不同生育期间的差异(P<0.05)。下同。

Fig. 1 The abundance of ammonia-oxidizing bacteria in soils subjected to nitrogen addition at different growth stages

The small letters indicate a significant difference (P < 0.05) between fertilization treatments at the same growth stage. The capital letters indicate a significant difference (P < 0.05) among growth stages at the same fertilization treatment. TS: tillering stage; HS: heading stage; MS: maturity stage; the same below.

因子 Parameters	自由度 Degree of	氧化还」 Redo	氧化还原电位/(mV) Redox potentia		(g•kg ⁻¹) total cogen	土壤有机碳/(g·kg ⁻¹) Soil organic carbon		酸碱度 pH value	铵氮/(mg·kg ⁻¹) Ammonium nitrogen	硝氮/(mg·kg ⁻¹) Nitrate nitrogen
freedor	freedom	F	Р	F	Р	F	Р	P	Р	Р
施氮 N addition	1	2.71	0.175	3.84	0.122	5.66	0.076	0.627	0.31	0.691
生育期 Growth stage	2	384.82	< 0.001	0.47	0.643	3.94	0.064	0.001	0.001	0.003
施氮*生育期 N addition* Growth stage	2	7.71	0.014	4.53	0.055	2.65	0.131	/	/	1

	表3	不同生育期和氮肥施加对土壤理化性质的影响
Table 3	The effects of nitro	gen application, growth stage, and their interaction on soil properties

注:氧化还原电位(Eh)、总氮(TN)、土壤有机碳(SOC)的数据满足正态性检验,采用重复测量方差分析的方法进行统计分析;酸碱度(pH)、铵氮(NH₄⁺-N)、硝氮(NO₃⁻-N)的数据不满足正态性检验,采用非参数检验的方法进行统计分析。

Note: The data of redox potentia (Eh), soil total nitrogen (TN), and soil organic carbon (SOC) meet the normality test and are statistically analyzed using repeated analysis of measurement variance; the data of pH, ammonium nitrogen (NH_4^+-N) , and nitrate nitrogen (NO_3^--N) do not meet the normality test and are statistically analyzed using non-parametric test.





25.31 mg·kg⁻¹,P<0.05)、SOC(30.91~27.60 g·kg⁻¹,P<0.05)均呈现显著性的季节性变异。其中,pH呈现逐期降低的季节性变异趋势,Eh呈现逐期升高的季节性变异趋势。TN未表现出显著的季节性变异。

在分蘖期,与未施氮肥时相比(pH:5.8,Eh: 83 mV,NH₄⁺-N:69.55 mg·kg⁻¹,NO₃⁻-N:11.50 mg·kg⁻¹, TN:2.47 g·kg⁻¹,SOC:29.51 g·kg⁻¹),施加氮肥的情形 下分蘖期 pH显著增加了 0.12 个单位(*P* < 0.05),Eh 显著降低了 4.00 mV(*P* < 0.05),NH₄⁺-N显著增加了 20.23 mg·kg⁻¹(*P* < 0.05),NO₃⁻-N、TN、SOC 含量未表现 出显著性差异。在抽穗期,与未施氮肥时相比(pH: 5.3,Eh:108.33 mV,NH₄⁺-N:47.24 mg·kg⁻¹,NO₃⁻-N: 9.68 mg·kg⁻¹,TN:2.50 g·kg⁻¹,SOC:28.49 g·kg⁻¹),施加氮 肥的情形下 pH显著增加了 0.14 个单位(*P* < 0.05),Eh 显著降低了 6.67 mV(*P* < 0.05),NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、TN、 SOC没有显著性差异。在成熟期,与未施氮肥时相比 (pH:5.0,Eh:124.00 mV,NH₄⁺-N:20.29 mg·kg⁻¹,NO₃⁻-N: 6.14 mg·kg⁻¹,TN:2.38 g·kg⁻¹,SOC:27.59 g·kg⁻¹), 施加氮肥的情形下 pH、Eh、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、TN、 SOC均无显著性变化(图2)。

从图3可知,未施加氮肥时,半程氨氧化菌AOA、 AOB的丰度与土壤理化因子如pH、Eh、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、TN、SOC的相关性并不显著,而全程氨氧化菌Clade A、Clade B的丰度与土壤TN呈显著的负相关(P<





pH:酸碱度;Eh:氧化还原电位;NH₄⁺-N:铵态氮;NO₃⁻-N:硝态氮;TN:全氮;SOC:土壤有机碳;AOA:氨氧化古菌;AOB: 氨氧化细菌;Clade A:全程氨氧化菌分支Clade A;Clade B:全程氨氧化菌分支Clade B。**P*<0.05,***P*<0.01。

Fig. 3 Correlation between ammonia oxidizing bacteria abundance and soil properties

pH: pH value; Eh: redox potentia; NH₄⁺-N: ammonium nitrogen; NO₃⁻-N: nitrate nitrogen; TN: soil total nitrogen; SOC: soil organic carbon; AOA: ammonia-oxidizing archaea; AOB: ammonia-oxidizing bacteria; Clade A: Comammox *Nitrospira* Clade A; Clade B: Comammox *Nitrospira* Clade B. **P*<0. 05,***P*<0. 01.

0.05)。全程氨氧化菌 Clade A、Clade B的丰度均与半 程氨氧化菌 AOA、AOB的丰度呈极显著的正相关(P < 0.01)。施加氮肥后,半程氨氧化菌中,AOA 丰度与土 壤 Eh 呈现显著的正相关(P < 0.01),与 pH、NH₄⁺-N和 NO₃⁻-N具有显著的负相关性(P < 0.01和P < 0.05); AOB丰度与土壤Eh呈显著的正相关(P < 0.01和P < 0.05); AOB丰度与土壤Eh呈显著的页相关(P < 0.01和P < 0.05)。Clade A的丰度与pH呈显著负相关(P < 0.01和P < 0.05)。Clade A的丰度与pH呈显著负相关(P < 0.05),与 Eh 呈显著正相关(P < 0.05)。Clade A的丰度与pH呈显著的相关性。Clade A 丰 度与半程氨氧化菌 AOA、AOB的丰度仍呈现显著的 正相关(P < 0.05和P < 0.01),Clade B 丰度与半程氨 氧化菌 AOA、AOB的丰度间均无显著的相关性。

3 讨论

3.1 氮肥对水稻土全程氨氧化菌的影响 就丰度 而言,全程氨氧化菌(Clade A、Clade B)比半程氨氧 化菌(AOA、AOB)高出1~2个数量级,表明在酸性 水稻土环境,全程氨氧化菌相比半程氨氧化菌更 具竞争优势,而这一竞争优势在水稻的3个生育期 都能维持。这一结果与在非酸性的稻田土壤中得 出的结论不同^[25,33],表明稻田全程、半程氨氧化菌 生态位分化和富集水平受非生物性因子pH值强烈 调控。事实上,不仅在酸性的农业土壤^[17-18],在酸 性的非农业土壤(如pH < 6.0森林土壤)也有类似的发现,即全程氨氧化菌比半程氨氧化菌丰富,全程氨氧化菌单一分支(Clade A、Clade B)的丰度高于AOA或AOB^[3]。此外,许多研究发现全程氨氧化菌在自来水管道、污水处理厂、砂滤池、水库等寡营养的水生或淹水环境中具有竞争优势^[5-6.8]。从水生或淹水环境分离培养得到的 Comammox *Nitrospira* 菌株对 NH₃的亲和力往往高于 AOA 和 AOB^[16],而它们的底物抑制浓度低于 AOA 与 AOB^[22],这表明相较于半程氨氧化菌,全程氨氧化菌更适应于生长在湿润、还原或寡营养的环境。然而,并不能由此简单地认为全程氨氧化菌仅适宜生活在贫瘠的环境中。

盆栽试验结果表明,施加氮肥至酸性稻田土 壤并不会导致全程氨氧化菌(Clade A、Clade B)丰 度高于半程氨氧化菌(AOA、AOB)这一分布格局发 生变化。原因在于施加氮肥至酸性稻田不仅对半 程氨氧化菌,甚至对全程氨氧菌并未产生显著性 影响。再者,施肥与生育期的交互效应对全程及 半程氨氧菌的影响并不显著。这与Wang等^[27]的 研究结果类似,即对一弱酸性稻田土壤进行8组施 肥处理,在一半的施肥处理组(4组)并未发现全 程、半程氨氧化菌丰度发生显著性改变。有趣的 是,施加氮肥至一些稻田^[34]或非稻田生态系统^[35], 土壤中的全程氨氧化菌并未衰减反而富集,呈现 出与半程氨氧化菌响应一致的趋势^[18-19]。由此可 见,全程氨氧化菌不仅能在寡营养的环境,也能在 富营养的环境保持生长稳定性和竞争优势。

对于全程氨氧化菌的2个分支--Clade A、 Clade B, 一般来说 Clade A 在土壤中性或微碱性的 稻田分布更为广泛,而Clade B在酸性稻田的富集 水平更高^[25-26]。本研究证实了LIU等(2021)的发 现^[25],即酸性稻田环境更利于Clade B的富集。有 研究指出,施加氮肥至土壤,Clade A 会呈现富集的 趋势,Clade B的数量则会呈现衰减趋势^[27]。与之 不同的是,水稻全生育期观测实验发现,Clade B与 Clade A一样,对尿素施加的响应不敏感,并未受施 氮与生育期的交互效应显著影响。Clade B丰度高 于Clade A 丰度这一分布格局并未随着外源氮素输 入而发生改变。此外,也有研究发现,栖息于稻田 环境的Clade B可能对氮肥施加的响应不敏感^[36]。 上述结果表明,尽管Clade B可能偏好于酸性、寡营 养的环境,但Clade B与Clade A一样能够适应富氮 或氨浓度波动的环境。

3.2 稻田土壤全程氨氧化菌对氮肥施加的响应 机制 大量研究证实,pH值、铵态氮、氧化还原电 位Eh、氧气含量是水稻及非水稻土中的全程氨氧 化菌分布的关键调控因子[11-12,36]。值得指出的是, 本研究发现,土壤总氮也可能是酸性水稻田全程 氨氧化菌丰度的重要预测因子,其值越高则预示 土壤中 Clade A、Clade B 丰度越低。然而,随着外 加肥料投入,土壤总氮可能并非全程氨氧化菌丰 度的指示因子或调控因子,酸性水稻田全程氨氧 化菌(如Clade A)丰度可能主要受土壤酸碱度、氧 化还原电位影响。具体来说,未施氮肥、施氮肥两 种情形下,酸性水稻田全程氨氧化菌丰度的环境 指示因子或调控因子是不同的。未施氮肥情形 下,全程氨氧化菌的丰度可能更多地受内源性底 物(即NH₃)或氨化作用的影响。土壤总氮含量越 高,氨化强度越大,Comammox Nitrospira Clade A、 Clade B可能越不活跃。施氮肥情形下,酸性水稻 田全程氨氧化菌生长繁殖的调控因子可能并非 NH3,而是土壤pH和Eh。此外,本研究还发现,氮 肥施加情形下 Clade A 而非 Clade B 的丰度与土壤 pH、Eh值密切相关。氮肥施加会影响全程、半程氨 氧化菌的群落共变性,其中Clade B丰度与AOA、 AOB丰度正向共变趋势会随着氮肥输入而消失。

尽管Clade A 丰度在分蘖期呈现下降趋势,但 就整个生育期而言,其对尿素施加的响应并不敏 感。在分蘖期,与未施氮肥相比,施肥情形下分蘖 期Clade A丰度下降可能是土壤 NH⁺-N浓度升高、 pH上升和Eh降低综合作用的结果。然而,随着时 间推移,由于水稻的氮需求量不断增加和持续的 硝化作用,在抽穗期,施氮处理下土壤铵态氮含量 恢复至对照水平,在成熟期,施氮处理下土壤pH和 Eh恢复至对照水平,pH、Eh和NH₄+-N对全程氨氧 化菌分支Clade A 生长繁殖的调控效应也相应地减 弱,抽穗期、成熟期施氮情形下的Clade A 丰度与对 照相比无显著差异。归根结底,全程氨氧化菌群 落之所以能在底物、酸碱度和氧化还原电位波动 的环境维持一定的生长稳定性,并且相对于AOA、 AOB 保持竞争优势主要和其生理生化特性、代谢 多样性和物种多样性有关。研究表明,全程氨氧 化菌含有多种尿素转运蛋白,其中包括对尿素高 亲和力的转运蛋白ABC,不仅能够以氨为底物,也 可以直接吸收尿素并加以转化利用[10]。尽管外施 氮肥的情形下 Clade A 丰度受 pH 负向调控, 受 Eh 正向调控,但是在抽穗期,相比于对照组,施氮引 起的土壤 pH升高和 Eh 降低不足以对 Clade A 的生 长繁殖产生显著性影响。这是因为,Clade A 能在 较低的 Eh(低于 250 mV^[24])、较宽的 pH 值范围 (4.0~6.5)^[5,37]生长良好。据此,推测施氮肥情形 下,由分蘖期至抽穗期、成熟期Clade A 的丰度表现 为先增加后稳定的趋势更多地取决于 NH_*/NH_的 响应。此外,Clade A具有较高的生物多样性,拥有 多个分支如 Clade A.1、Clade A.2 和 Clade A.3、 Clade A.4,这些分支的生活方式、氨亲和力和环境 偏好性不尽相同^[12,36]。Clade A.1 及部分Clade A.2、 Clade A.3 更偏爱于贫氮低氧的水生环境[38],表现 出对游离氨更高的亲和力。相比Clade A.1、Clade A.3、Clade A.4, Clade A.2 尤其是其进化分支 Clade A.2.1 似乎更能适应陆地生境^[38]。有趣的是,栖息 于农业酸性土壤的Clade A.2不仅不恐氮,反而在 外源性氮输入情形下呈现大幅增长趋势^[39]。

Clade B对尿素施加的响应不敏感,即使在分 蘖期氨浓度大幅度上升其丰度也没有降低,并且 与Clade A不同的是,施加氮肥的情形下Clade B丰 度并没有表现出显著的季节性差异,这一结果并 不令人意外。首先,与 Clade A 具有的 RH 型氨转 运载体相比, Clade B 具有对底物更高亲和力的 Amtb 型氨转运载体系列^[10]。再者, Clade B 含有编 码脲酶的基因与多种尿素转运蛋白(尿素 ABC 转 运蛋白、外膜孔蛋白 fmdC、尿素羧化转运蛋白 uctT 等)^[10,22]。此外, Clade B 能够在 pH 为 4.0~6.0 的酸 性环境良好地生长繁殖^[5]。而本研究供试水稻土 pH 为 4.9~6.0,并且处于缺氧状态(Eh < 250 mV)^[24], 在这种缺氧酸性条件下, Clade B 还能够以甲酸为 底物完成自身的生长代谢^[10,24]。因此, Clade B 能 够在氨浓度低或波动的环境稳定地生长。重要的 是,与 Clade A 类似, Clade B 同样具有较高的生物 多样性^[36,39], 已发现的分支有 Clade B.1、Clade B.2、 Clade B.3, 其中 Clade B.1 能够富集于高营养的土 壤环境^[39]。

4 结论

笔者通过盆栽实验,探究了水稻种植情形下, 酸性稻田全程氨氧化菌的两大分支 Clade A 和 Clade B对施加氮肥的响应敏感性及其季节变异。 研究结果表明:

(1)全程氨氧化菌的季节变异不显著。作为 分蘖期、抽穗期、成熟期氨氧化菌的优势种群,全 程氨氧化菌对尿素施加的响应往往不敏感;

(2)施加氮肥与未施加氮肥的情形下,调控全 程氨氧化菌丰度的环境因子可能不同。未施氮肥 情形下,全程氨氧化菌分支A和B的丰度可能主要 受底物调控,与土壤总氮呈负相关。施加氮肥的 情形下,全程氨氧化菌生长繁殖较少受底物因子 影响,分支A的丰度可能主要受环境因子pH、Eh 以及NH₄⁺-N的调控;

(3)施加氮肥后,Clade A 丰度与AOA、AOB 丰 度仍呈现正向共变趋势,而Clade B 丰度与AOA、 AOB 丰度的正向共变趋势消失。

未来可以将本研究结合大田试验进一步验证 试验结果,并且结合大田环境在种植不同水稻品 种、不同种植管理方式、施加不同量(梯度)或不同 种类的氮肥的情形下,进一步探究分析酸性水稻 土壤全程氨氧化菌对氮肥施加的响应。

参考文献:

[1] LI Y, CHAPMAN S, NICOL G, et al. Nitrification and

nitrifiers in acidic soils [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2018, 116: 290-301.

- [2] DAIMS H, LEBEDEVA E V, PJEVAC P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria[J]. Nature, 2015, 528: 504–509.
- [3] VAN KESSEL M A H J, SPETH D R, ALBERTSEN M, et al. Complete nitrification by a single microorganism[J]. Nature, 2015, 528: 555–559.
- [4] KITS K D, SEDLACEK C J, LEBEDEVA E V, et al. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle [J]. Nature, 2017, 549: 269–272.
- [5] HU H W, HE J Z. Comammox-a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle [J]. Journal of Soils and Sediments, 2017, 17(12): 2709–2717.
- [6] XIA F, WANG J G, ZHU T, et al. Ubiquity and diversity of complete ammonia oxidizers (comammox) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(24): e01390e01318.
- [7] LIU S, WANG H, CHEN L, et al. Comammox Nitrospira within the Yangtze River continuum: community, biogeography, and ecological drivers [J]. The ISME Journal, 2020, 14: 2488–2504.
- [8] ZHOU L J, HAN P, ZHAO M, et al. Biotransformation of lincomycin and fluoroquinolone antibiotics by the ammonia oxidizers AOA, AOB and comammox: a comparison of removal, pathways, and mechanisms [J]. Water Research, 2021, 196: 117003.
- [9] PJEVAC P, SCHAUBERGER C, POGHOSYAN L, et al. AmoA-targeted polymerase chain reaction primers for the specific detection and quantification of comammox Nitrospira in the environment [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1508.
- [10] PALOMO A, PEDERSEN A G, FOWLER S J, et al. Comparative genomics sheds light on niche differentiation and the evolutionary history of comammox *Nitrospira* [J]. The ISME Journal, 2018, 12(7): 1779–1793.
- [11] GAO W, FU Y, FAN C, et al. Factors predictive of the biogeographic distribution of comammox *Nitrospira* in terrestrial ecosystems [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2023, 184: 109079.
- [12] ZHU G, WANG X, WANG S, et al. Towards a more laborsaving way in microbial ammonium oxidation: a review on complete ammonia oxidization (comammox) [J]. The Science of the Total Environment, 2022, 829: 154590.
- [13] KE X, ANGEL R, LU Y, et al. Niche differentiation of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers in rice paddy soil [J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(8): 2275–2292.
- [14] XU S, WANG B, LI Y, et al. Ubiquity, diversity, and activity of comammox *Nitrospira* in agricultural soils [J]. The Science of the Total Environment, 2020, 706: 135684.
- [15] ZHAO J, BELLO M, MENG Y, et al. Selective inhibition of ammonia oxidising Archaea by simvastatin stimulates growth of ammonia oxidising bacteria[J]. Soil Biology and

Biochemistry. 2020, 141: 107673.

- [16] KITS K D, SEDLACEK C J, LEBEDEVA E V, et al. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle [J]. Nature, 2017, 549: 269–272.
- [17] HU J, ZHAO Y, YAO X, et al. Dominance of comammox *Nitrospira* in soil nitrification [J]. The Science of the Total Environment, 2021, 780: 146558.
- [18] ORELLANA L H, CHEE-SANFORD J C, SANFORD R A, et al. Year-round shotgun metagenomes reveal stable microbial communities in agricultural soils and novel ammonia oxidizers responding to fertilization [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(2): e01646 – e01617.
- [19] TAKAHASHI Y, FUJITANI H, HIRONO Y, et al. Enrichment of comammox and nitrite-oxidizing *Nitro-spira* from acidic soils [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1737.
- [20] SHEN J P, ZHANG L M, ZHU Y G, et al. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing Archaea communities of an alkaline sandy loam [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(6): 1601–1611.
- [21] XIE J, WANG Z, WANG Y, et al. Manure combined with biochar reduces rhizosphere nitrification potential and amoA gene abundance of ammonia-oxidizing microorganisms in acid purple soil [J]. Applied Soil Ecology, 2023, 181: 104660.
- [22] LI C, HE Z Y, HU H W, et al. Niche specialization of comammox *Nitrospira* in terrestrial ecosystems: Oligotrophic or copiotrophic? [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2023, 53(2): 161–176.
- [23] 陈娜, 刘毅, 肖谋良, 等. CO₂倍增和施氮对水稻不同 生长期土壤反硝化细菌丰度的影响 [J]. 环境科学研 究, 2019, 32(4): 683-691.
- [24] 石秀丽, 郭萌萌, 张莹, 等. 单步硝化作用与全程氨氧化 微生物研究进展 [J]. 草业学报, 2018, 27(7): 196-203.
- [25] LIU H, HU H, 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 and Biochemistry, 2021, 156: 108192.
- [26] LIU T, WANG Z, WANG S, et al. Responses of ammoniaoxidizers and comammox to different long-term fertilization regimes in a subtropical paddy soil [J]. European Journal of Soil Biology, 2019, 93: 103087.
- [27] WANG J, WANG J, RHODES G, et al. Adaptive responses of comammox *Nitrospira* and canonical ammonia oxidizers to long-term fertilizations: implications for the relative contributions of different ammonia oxidizers to soil nitrogen cycling [J]. The Science of the Total Envi-

ronment, 2019, 668: 224-233.

- [28] NIE S A, LI H, YANG X, et al. Nitrogen loss by anaerobic oxidation of ammonium in rice rhizosphere [J]. The ISME Journal, 2015, 9(9): 2059–2067.
- [29] 鲍士旦. 土壤农化分析 [M]. 3版. 北京: 中国农业出版 社, 2008:39-89.
- [30] BEMAN J M, FRANCIS C A. Diversity of ammoniaoxidizing Archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahía del Tóbari, *Mexico* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(12): 7767–7777.
- [31] ROTTHAUWE 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.
- [32] JIANG R, WANG J G, ZHU T, et al. Use of newly designed primers for quantification of complete ammonia-oxidizing (comammox) bacterial clades and strict nitrite oxidizers in the genus *Nitrospira* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(20): e01775-e01720.
- [33] LI D, REN Z, ZHOU Y, et al. Comammox *Nitrospira* and ammonia-oxidizing Archaea are dominant ammonia oxidizers in sediments of an acid mine lake containing high ammonium concentrations [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2023, 89(3): e0004723.
- [34] ZHOU X, WANG S, MA S, et al. Effects of commonly used nitrification inhibitors-dicyandiamide (DCD), 3, 4dimethylpyrazole phosphate (DMPP), and nitrapyrin-on soil nitrogen dynamics and nitrifiers in three typical paddy soils [J]. Geoderma, 2020, 380: 114637.
- [35] LI C, HU H W, CHEN Q L, et al. Comammox Nitrospira play an active role in nitrification of agricultural soils amended with nitrogen fertilizers [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 138: 107609.
- [36] GAO F, LI Y, FAN H, et al. Main environmental drivers of abundance, diversity and community structure of comammox *Nitrospira* in paddy soils [J]. Pedosphere, 2023, 33(5): 808–818.
- [37] LI D, FANG F, LIU G. Efficient nitrification and lowlevel N₂O emission in a weakly acidic bioreactor at low dissolved-oxygen levels are due to comammox [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(11): e00154-e00121.
- [38] LI C, HU H, CHEN Q, et al. Niche specialization of comammox Nitrospira clade A in terrestrial ecosystems [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2021, 156: 108231.
- [39] LIN Y, FAN J, HU H W, et al. Differentiation of individual clusters of comammox *Nitrospira* in an acidic Ultisol following long-term fertilization [J]. Applied Soil Ecology, 2022, 170: 104267.

Response of comammox *Nitrospira* to nitrogen fertilization in acidic paddy soil

FU Yajun¹, GAO Wenlong^{2,3}, CHEN Miao^{2,3}

(1. College of Ecology and Environment, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101; 3. Hainan Danzhou Tropical Agro-ecosystem National Observation and Research Station, Danzhou 571737, Hainan, China)

Abstract: In order to reveal the differences in response and sensitivity of comamox Nitrospira and incomplete nitrifiers to nitrogen addition in acidic rice fields, a pot experiment was conducted to investigate the impact of urea fertilization, in conjunction with growth stage, on complete nitrifiers, and to compare their responsiveness to nitrogen (N) fertilization with that of incomplete nitrifiers in acidic paddy soils. The research results revealed that irrespective of fertilization conditions, comammox Nitrospira (Clade A: 3.24×10⁸-7.24×10⁸ copies · g⁻¹, Clade B: 2.14×10⁸-1.48× 10° copies $\cdot g^{-1}$) rather than ammonia - oxidizing archaea (AOA: $2.00 \times 10^{7} - 4.37 \times 10^{7}$ copies $\cdot g^{-1}$) and nitriteoxidizing bacteria (AOB: $1.35 \times 10^7 - 3.31 \times 10^7$ copies $\cdot g^{-1}$), were the dominant ammonia oxidizers across tillering, heading, and maturity stages. Neither urea fertilization (Clade A: P = 0.762, Clade B: P = 0.398) nor growth stage (Clade A: P = 0.264, Clade B: P = 0.237), nor their interaction (Clade A: P = 0.316, Clade B: P = 0.294), significantly influenced comammox Nitrospira clades A and B, as their populations remained consistent across the fertilizer treatments and seasons. It is plausible that the environmental factors governing comammox bacterial abundance in urea-fertilized and unfertilized soils may vary. In the absence of urea, the abundance of comammox Nitrospira clades A (R = -0.73, P = 0.027) and B (R = -0.75, P = 0.019) exhibited a negative correlation with soil N, suggesting that increased ammonia, ammonification, and organic N may not be conducive to comammox bacterial growth and activity in unfertilized soils. Conversely, in the presence of urea, comammox bacteria, especially clade A, were notably influenced by soil pH and redox potential (Eh). Notably, urea application had the potential to alter the interplay between complete and incomplete nitrifiers, as evidenced by the absence of a positive mode of population co-variation of clade B with AOA and AOB following urea application.

Keywords: comammox Nitrospira; incomplete nitrifiers; urea application; growth stage; acidic paddy soil

(责任编辑:潘学峰)