

橘园绿肥种植对土壤氨氧化微生物的影响

魏振康, 王雪, 伍玉鹏, 胡荣桂, 姜炎彬

引用本文:

魏振康, 王雪, 伍玉鹏, 胡荣桂, 姜炎彬. 橘园绿肥种植对土壤氨氧化微生物的影响[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(1): 122–132.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2023-0446>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

模拟水位下降与刈割对高寒湿地土壤氨氧化与反硝化微生物的影响

孙翼飞, 沈菊培, 张翠景, 孙书存, 贺纪正

农业环境科学学报. 2017, 36(11): 2356–2364 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0589>

氟磺胺草醚及其降解菌对大豆生长及生物固氮的影响

周聪, 陈未, 高岩, 施曼, 李江叶, 刘丽珠, 陈金林

农业环境科学学报. 2021, 40(12): 2660–2668 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0264>

东北沼泽湿地土壤中氨氧化微生物活性和丰度研究

谢月, 梁红, 宋立全, 王清波, 付东风, 高大文

农业环境科学学报. 2018, 37(3): 546–551 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0992>

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

农业环境科学学报. 2019, 38(10): 2386–2394 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0231>

生物炭原位添加对养殖池塘底泥中微生物群落结构的影响

赵汉胤, 陈潘毅, 唐欣哲, 陈以芹, 李娟英

农业环境科学学报. 2021, 40(12): 2770–2778 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0434>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

魏振康, 王雪, 伍玉鹏, 等. 橘园绿肥种植对土壤氨氧化微生物的影响[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(1): 122–132.

WEI Z K, WANG X, WU Y P, et al. Effects of green manure planting on soil ammonium oxidizing microorganisms in citrus orchards[J].

Journal of Agro-Environment Science, 2024, 43(1): 122–132.



开放科学 OSID

橘园绿肥种植对土壤氨氧化微生物的影响

魏振康, 王雪, 伍玉鹏, 胡荣桂, 姜炎彬*

(华中农业大学资源与环境学院, 武汉 430070)

摘要:本研究以当阳凤凰山长期定位施肥柑橘试验基地为平台,进行了自然生草(NG)、人工种植光叶苕子(LP)以及光叶苕子混播于自然生草(NL)等三种绿肥处理,通过植物群落调查、土壤理化性质测定,以及qPCR和Illumina Miseq高通量测序的方法,阐明橘园土壤氨氧化微生物AOA和AOB的功能基因丰度和群落结构对不同绿肥种植处理的响应特征,并探讨植物群落和土壤理化因子对它们的影响。研究结果表明:相比于NG,人工种植绿肥(LP和NL)对AOA和AOB数量的影响不一,LP降低了AOA和AOB的*amoA*基因拷贝数,NL降低了AOA-*amoA*但增加了AOB-*amoA*基因拷贝数;LP和NL中AOA的Ace指数和Chao指数显著高于NG,LP中AOB的Shannon指数显著高于NG,三个处理的 β 多样性差异显著;三种绿肥种植处理下AOA共获得119个OTU,优势门和属分别是泉古菌门和*norank—Crenarchaeota*,其中*norank—Crenarchaeota*在NG中的相对丰度显著高于LP和NL;AOB共获得142个OTU,优势门和属分别是变形菌门和亚硝化螺菌属,其中亚硝化螺菌属的相对丰度在不同处理中有显著差异,其LP中最高,为45.87%;Mantel检验和冗余-层次分割分析结果表明,氨氧化微生物的丰度、多样性和组成受到绿肥种植后的植物因子(如群落高度、盖度、多样性、地上生物量和地下生物量、根系碳氮含量等)和土壤因子(如pH、土壤含水量、总碳、总氮、铵态氮、硝态氮和速效磷含量等)的共同影响。该研究说明在橘园种植绿肥可改变地上植物群落特征和土壤理化性质,从而使土壤中氨氧化微生物的数量和群落结构发生变化,其中光叶苕子混播于自然生草的生草模式可明显增加土壤氨氧化微生物量,促进土壤的硝化作用和改善果园生态环境,因此,实际应用中可优先考虑此模式。

关键词:氨氧化微生物;绿肥;功能基因;群落组成;丰度

中图分类号:S666;S154.3 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2024)01-0122-11 doi:10.11654/jaes.2023-0446

Effects of green manure planting on soil ammonium oxidizing microorganisms in citrus orchards

WEI Zhenkang, WANG Xue, WU Yupeng, HU Ronggui, JIANG Yanbin*

(College of Resources and Environment, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Planting experiments with three types of green manure, which were natural grasses(NG), *Vicia villosa* var. *glabrescens*, a legume single planted(LP), and *V. villosa* var. *glabrescens* mixed planted in the NG(NL), were conducted in a long-term positioning fertilization experimental base in Fenghuangshan, Dangyang. Plant communities and soil physical and chemical properties were surveyed and measured, and the functional gene abundance and community structure of ammonium oxidizing microorganisms for soil samples were analyzed using qPCR amplification and Illumina MiSeq High-Throughput Sequencing. Next, the relationships between ammonium oxidizing microorganisms and plant community factors and soil properties were clarified by a Mantel test and redundant analysis with hierarchical partitioning (RDA-HP). The results showed that: Compared with the NG, the LP and NL had different effects on the abundances of AOA-*amoA* and AOB-*amoA*; the LP reduced the amounts of AOA-*amoA* and AOB-*amoA*, while the NL decreased AOA-*amoA* but increased AOB-*amoA*. The Ace indice and Chao indice of AOA in LP and NL were significantly higher than those in NG.

收稿日期:2023-06-08 录用日期:2023-10-25

作者简介:魏振康(2000—),男,山东济南人,硕士研究生,研究方向为环境生态学。E-mail:2412735460@qq.com

*通信作者:姜炎彬 E-mail:jiangyanbin@mail.hzau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金联合基金项目(U2240222)

Project supported: Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China (U2240222)

Simultaneously, the Shannon index of AOB in LP was significantly higher than that in NG, and the β diversity among the three treatments differed significantly. In the three treatments, 119 OTUs of AOA were obtained, with the dominant phylum and genus being Crenarchaeota and *norank*—Crenarchaeota, respectively; meanwhile, 142 OTUs were obtained for AOB, with the dominant phylum and genus being Proteobacteria and *Nitrospira*, respectively. The relative abundance of *Nitrospira* was significantly higher in LP (45.87%). According to the Mantel test and RDA-HP, the abundance, composition, and diversity of ammonium oxidizing microorganisms were closely related to plant factors (plant height, cover, and diversity, shoot and root biomasses, and carbon and nitrogen contents in roots) and soil properties (pH, soil water content, total carbon and nitrogen contents, and ammonium, nitrate, and available phosphorus contents). The study indicates that green manure planting in citrus orchards alters the plant community and soil physicochemical properties and modifies the abundance and community structure of soil ammonium oxidizing microorganisms. Within the three ground cover treatments, NL has a markedly higher abundance of ammonia-oxidizing microorganisms, thus promoting soil nitrification and improving the ecological environment of the orchard. Therefore, intercropping legumes with NG in orchards is recommended for practical applications.

Keywords: ammonium oxidizing microorganism; green manure; functional gene; community composition; abundance

随着社会的不断进步,生态果园等可持续发展理念深入人心,人们逐渐认识到清耕法不再适合农业生产的要求,果园覆草、果树地膜覆盖和果园绿肥种植等一些先进的果园管理模式开始在果园中发挥作用^[1-4]。在果园生境下生长,通过直接种植、翻压施用、作物堆肥沤制后再施用等方式促进果树生长发育的绿色植物称为果园绿肥^[5]。果园绿肥种植可分为自然生草和人工生草,其中,自然生草是指利用当地果园常见杂草,经过自然竞争和连续刈割,自然筛选出适宜当地自然生态环境且生殖能力强的无害杂草,生长后达到覆盖培肥果园的目的^[6],人工生草是考虑到当地果树品种性质、土壤、气候条件和经济生态等因素后,有选择地种植一些无害、培肥能力强或经济效益高的草种。果园自然生草和人工生草在改善果园生态环境,促进果实优质高产等方面都已经取得了良好的生态经济效益^[7-8]。

微生物介导的硝化作用是农业生态系统氮循环的关键环节之一,通过硝化作用能减少土壤氨的挥发,促进植物对土壤氮素的吸收利用。氨氧化反应是硝化作用的关键限速步骤,氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)作为氨氧化反应的主要驱动者,其群落结构、生态位分异和丰度等受土壤环境因子的影响。在不同pH的土壤中,AOA和AOB对土壤硝化作用的贡献存在极大差异,AOA在酸性土壤中更为活跃,AOB在中性和碱性土壤中是硝化作用的主要承担者^[9]。施肥方式不同,植被类型的改变均会导致氨氧化微生物种群结构、丰度和活性发生差异^[10]。在果园生态系统中,不同的土壤类型、土壤条件、耕作制度等果园管理措施等都会影响土壤环境,从而影响土壤的硝化能力和氨氧化微生物的活性^[11]。果园生草复合系统会改变植物-微生物的资源利用体系,势必会影

响土壤氮素养分转化和供给情况^[12-15],从而使得土壤微生物生长所需的养分物质数量和质量发生改变^[16-17]。研究表明,有机肥可以通过改变土壤理化性质从而降低盐分产生的负面影响^[18]。绿肥种植、刈割、腐解还可以通过影响土壤的各项理化性质,如土壤温度、土壤板结程度、土壤pH等,引起土壤微环境的变化,间接对土壤微生物群落产生影响^[19-20]。但果园绿肥种植后对土壤氨氧化微生物AOA和AOB的影响研究鲜见报道。识别氨氧化微生物群落在果园不同生草系统中的生态特征,对于丰富氮循环的认识以及果园生草管理具有重要意义。

本研究以湖北省当阳市长期定位施肥柑橘试验基地为研究对象,选取了自然生草、光叶苕子(*Vicia villosa* var. *glabrescens*)以及光叶苕子混播自然生草等3种绿肥处理,通过对柑橘园0~20 cm耕作层土壤中土壤理化性质、氨氧化微生物功能基因丰度及群落结构等进行分析,探究不同绿肥种植对橘园土壤氨氧化微生物的影响,从而为果园的生态管理方式方法提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验在湖北省宜昌市当阳市凤凰山柑橘基地(30°39'48.98"N, 111°48'24.82"E)进行。该地属亚热带季风气候,平均日照数1 850 h,年均气温16.4℃,年均降雨量936~1 048 mm,降雨多集中于夏季。试验地海拔79 m,土壤类型为典型黄棕壤;柑橘品种为无核椪柑,树龄15 a,行距3 m×4 m,树势中等,均处于盛果期。每年6月和12月施肥,施肥量为氮素410 kg·hm⁻²,磷素240 kg·hm⁻²,钾素381 kg·hm⁻²,肥料分别为尿素、过磷酸钙和硫酸钾。该柑橘园绿肥有

3种生草方式^[21]: (1)自然生草(NG): 园内没有种植特定草种, 自然长出的各种杂草通过自然竞争和连续刈割, 最后剩下适应当地自然生态环境的草种; 每年5月和9月刈割, 刈割后平铺覆盖果园地面; (2)光叶苕子(LP): 清除自然生草后, 于每年10月在果树行间撒播光叶苕子, 播种量为 $75 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 次年5月刈割, 刈割后绿肥残体直接覆盖地面还田; (3)光叶苕子混播于自然生草中(NL): 保留自然生草, 并在果树行间撒播光叶苕子, 播种量为 $25 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 于每年5月刈割, 刈割后绿肥残体直接覆盖地面还田。与自然生草相对应, 以上的LP和NL又归为人工生草。所有生草处理于2013年开始实施。

1.2 样品采集及测定

3种生草方式分别选择3个面积为 120 m^2 重复小区(含10棵果树), 于2019年3月(光叶苕子初花期)在每个小区采用五点取样法对5个 $1 \text{ m} \times 1 \text{ m}$ 样方进行植物群落调查, 测定草本植物群落的盖度(Cover)、高度(Height)和各物种的个体数量等。随后, 齐地剪取样方中植物地上部分, 烘干称量获取地上生物量(SB)。用直径为 7.5 cm 的根钻在样方内以五点取样法钻取 $0 \sim 20 \text{ cm}$ 耕层土壤根系样品5份, 混匀后装入自封袋内, 带回实验室过20目筛分离植物根系及土壤。用去离子水洗净植物根系, 于 $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 杀青30 min, 随后调至 $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干至质量恒定并称量, 以获得地下生物量(RB)。利用粉碎机将烘干后的植物地上部分和地下部分分别磨碎、过100目筛。采用元素分析仪测定植物地上部分(STC、STN)和根系的总碳、总氮(RTC、RTN)含量^[22]。

土壤样品采集: 用土钻采集上述样方中 $0 \sim 20 \text{ cm}$ 土层, 混匀后分为三部分。一部分新鲜土样用于以下指标测定: 土壤容重(BD)(环刀法^[23])、含水量(SWC)(铝盒烘干法)、pH[玻璃电极法(水土比2.5:1)]、铵态氮(AN)(靛酚蓝比色法)、硝态氮(NN)(紫外分光光度法)、可溶性有机碳(DOC)[总有机碳分析仪测定离心(水土比5:1)过滤后的滤液]、可溶性有机氮(DON)[可溶性总氮(TDN)减去AN、NN氮的差]、TDN(碱性过硫酸钾-紫外分光光度法)、土壤微生物量碳氮(MBC、MBN)(氯仿熏蒸-硫酸钾浸提法^[24]); 一部分样品自然风干后, 仔细挑除土壤中混入的植物残根和石块等杂物, 磨碎, 采用碳氮元素分析仪测定总碳(TC)和总氮(TN), 采用浓硫酸消解-钼锑抗比色法测定总磷(TP), 通过 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法测定速效磷(AP), 用浓硫酸消煮-原子吸收火焰光

度法测定全钾(AK)^[25]; 一部分土壤于无菌密封袋中保存, 放入液氮内冰冻3 min再放置于冰盒带回实验室, 转入 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存, 用于后续微生物分析。

根据 PowerSoil DNA isolation 试剂盒(MoBio Laboratories Inc. San Diego, CA, USA)操作步骤, 从 0.5 g 、 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 土壤中提取土壤总DNA, 并用酶标仪检测土壤DNA数量和质量; 使用2%的琼脂糖凝胶电泳的方法测定土壤DNA的完整性^[26]。

AOA单端序列分析中两种引物分别为 amoAF ($5' - \text{STAATGGTCTGGCTTAGACG} - 3'$) 和 amoAR ($5' - \text{GCGGCCATCCATCTGTATGT} - 3'$), PCR产物长度在600 bp左右; AOB单端序列分析中两种引物分别为 bamoA1F ($5' - \text{GGGGTTTCTACTGGTGTT} - 3'$) 和 bamoA2R ($5' - \text{CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC} - 3'$), PCR产物长度490 bp左右^[13]。采用SYBR Green法进行荧光定量PCR测定AOA和AOB的 amoA 基因丰度: 使用上述引物以及实时荧光定量PCR仪(CFX96, bio-rad, USA)对AOA和AOB的 amoA 基因进行扩增, 反应体系和反应程序见表1。扩增完成后, 取 $3 \mu\text{L}$ AOA和AOB amoA的PCR扩增产物, 用2%琼脂糖凝胶电泳检测其大小和质量。定量PCR以包含目的基因且拷贝数已知的质粒为标准模板, 按10倍梯度稀释制作标准曲线, 标准模板和待测样品均设3个重复, 以3个重复的均值作为最终结果^[27], PCR的效率为84.5%~87.3%, R^2 为0.991~0.997。

微生物的 Illumina Miseq 高通量测序^[28]: 对氨氧化微生物的AOA和AOB amoA基因的PCR扩增产物使用琼脂糖凝胶电泳鉴定和分离条带后再使用试剂盒 NanoDrop2000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA)进行胶纯化和检测定量。稀释至同一浓度后, 采用上海美吉生物 Illumina Miseq 测序仪对AOA和AOB amoA进行双末端(paired-end)测序。测序序列根据 overlap 关系采用 Flash 1.2.1 软件进行 pair-end 双端序列拼接, 随后用 QIIME 1.9.1 软件对不同样本的测序的原始序列进行质控筛选和嵌合体检验, 去除掉小于50 bp和出现错误的序列^[29], 使用UCHIME进行降噪和嵌合体清除。9个样本分别获得415 425条AOA和422 813条AOB amoA基因的优化序列。利用USEARCH11软件的Uparse算法在97%的相似度下对操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTU)的代表序列进行聚类分析^[30]。采用RDP classifier 2.1贝叶斯算法在功能基因组资源数据库(Func-

表1 实时荧光定量PCR扩增引物、反应体系及反应程序

Table 1 Real-time PCR amplification primers, reaction systems, and reaction procedures					
基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'~3') Primer sequence	扩增长度/bp Amplification growth	反应体系 Reaction system	反应程序 Reaction procedure
AOA	amoAF	STAATGGTCTGGCTTAGACG	600	2×SYBR Green Mix 7.5 μL, 正反引物(10 μmol·L ⁻¹)各0.7 L, gDNA 1 μL, ddH ₂ O 5.1 μL	95 ℃预变性 5 min; 95 ℃变性 10 s, 55 ℃退火 15 s, 72 ℃延伸 30 s, 40个循环
amoA	amoAR	GCGGCCATCCATCTGTATGT			
AOB	bamoA1F	GGGGTTTCTACTGCTGGT	490		
amoA	bamoA2R	CCCCCKGSAAAGCCTTCTTC			

tional Genomics Resources, FGR) 中对 97% 相似水平的 AOA 和 AOB *amoA* 基因的 OTU 代表序列进行分类学注释。利用 Mothur 1.30.2 按最小样本序列数对各样本进行抽平分析后, 各样本分别得到 29 640 条 AOA *amoA* 基因序列和 30 417 条 AOB *amoA* 序列。

1.3 数据分析

植物的群落多样性利用丰富度指数(R_p)、Shannon-Wiener 多样性指数(S_p)和均匀度 Pielou 指数(E_p)等进行测度^[31]。计算公式如下:

- (1) 丰富度指数: $R_p = S$;
- (2) 多样性指数: $S_p = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$;
- (3) 均匀度指数: $E_p = \frac{S_p}{\ln S}$

式中: S 为样方中所有物种数目, $P_i = N_i / N$, N_i 为第 i 个物种的个体数, N 为所有物种的个体数。

在 OTU 水平上, 土壤氨氧化微生物群落的 α 多样性使用 Chao、Ace、Simpson 和 Shannon 指数进行评估, 利用 Mothur 1.30.2 进行这些 α 多样性指数的计算^[32]; 利用非度量多维尺度 (Non-metric Multidimensional scaling, NMDS) 分析不同处理间氨氧化微生物的 β 多样性, 其对不同样本间的差异程度, 是通过点与点间的距离体现的, 最终可获得样本的空间定位点图。韦恩分析 (Venn) 用于统计不同处理间样本中共有和独有的 OTU 数目; 分别在门 (phylum) 和属 (genus) 分类水平上统计各样本的群落组成。

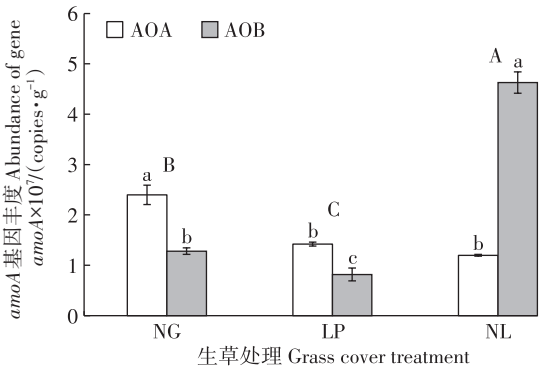
不同处理间的土壤氨氧化微生物的基因拷贝数、 α 多样性、门和属相对丰度的差异性均在 SPSS 中采用 One-way ANOVA 方法进行分析。不同处理组间的 β 多样性差异程度是否显著通过 PERMANOVA 分析实现; 通过 Mantel 检验分析确定植物和土壤因素对氨氧化微生物基因丰度、多样性和群落组成的影响; 冗余分析-层次分割法 (RDA-HP) 将层次分割法 (hierarchical partitioning, HP) 引入到冗余分析 (redundant analysis, RDA) 中, 可以为各解释变量分配单独效应,

并为共线性解释变量的相对重要性提供定量指标^[33-34], 用来确定环境因子对氨氧化微生物群落结构的影响及贡献率。使用 R 4.2.2 软件进行 Mantel 检验 (linkET 包)、Venn (VennDiagram 包)、NMDS (vegan 包) 和 RDA-HP (rdacca.hp 包) 分析。

2 结果与分析

2.1 绿肥种植对氨氧化微生物丰度的影响

不同绿肥种植模式下土壤氨氧化微生物的 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 基因拷贝数的变化如图 1 所示, NG、LP、NL 的 AOA-*amoA* 拷贝数分别为 2.40×10^7 、 1.42×10^7 、 1.20×10^7 copies·g⁻¹ 干土; 与 NG 相比, 人工生草的两种处理均有显著性变化, LP 和 NL 显著降低了土壤 AOA 的丰度 ($P < 0.05$), 而 LP 和 NL 两种人工生草之间 AOA 的丰度无显著性差异。NG、LP、NL 的



不同小写字母表示同一基因不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。不同大写字母表示不同处理间 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因丰度之和差异极显著 ($P < 0.01$)。
Different lowercase letters mean significant differences of the same gene AOA-*amoA* or AOB-*amoA* between different treatments at $P < 0.05$. Different uppercase letters mean the sum abundance of AOA-*amoA* and AOB-*amoA* are significantly different at $P < 0.01$ between different grass cover types.

图1 橘园绿肥种植对土壤 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 基因丰度的影响

Figure 1 Effects of green manure planting on the *amoA* abundances of AOA and AOB in citrus soils

AOB-*amoA* 拷贝数分别为 1.28×10^7 、 0.82×10^7 、 4.63×10^7 copies·g⁻¹干土;与NG相比,AOB丰度在LP中显著下降,而在NL中显著增加。两种氨氧化微生物总的丰度则表现为NL>NG>LP,且不同处理间差异显著,这说明生草种类的不同会显著影响土壤氨氧化微生物AOA和AOB的数量。

2.2 绿肥种植对氨氧化微生物多样性的影响

不同绿肥种植下土壤氨氧化微生物群落的α多样性结果显示,自然生草NG处理下AOA的Ace(85.60)、Chao(79.63)和Simpson(0.39)指数均较高,其中Ace和Chao指数显著高于人工生草LP和NL($P<0.05$,表2),但三种处理间的Simpson和Shannon指数均没有显著差异。AOB的Ace(60.14)和Chao(55.75)指数在NL中较高,但不同处理间无显著差异;Shannon指数在LP中最高(2.33),且显著高于NG,但Simpson指数(1.76)显著低于NG($P<0.05$,表2)。

基于NMDS分析,当stress<0.1时,可认为是一个好的排序,当stress<0.05时,则排序具有很好的代表性,因此在NG、LP和NL组间样本中的AOA和AOB在NMDS1、NMDS2的方向上都较好地地区分开来,具有较高的β多样性(图2)。AOA的Stress为0.01,且PERMANOVA分析的 $P=0.005$,表明不同绿肥种植处理的AOA群落组间区分度较高,对其β多样性的影响显著。同时,AOB的Stress为0.052,三种绿肥处理位于NMDS排序轴的不同象限(图2 AOB),且PERMANOVA分析的 $P=0.005$,组间也能很好地区分开来,说明不同绿肥种植对土壤AOB群落β多样性的影响也较为显著。

2.3 橘园绿肥种植对氨氧化微生物群落组成的影响

不同绿肥种植处理下AOA-*amoA*基因共获得119个OTU,三个处理共有的OTU数目为26个,占总OTU数目的21.85%,特有的OTU数目表现为NG>LP>

表2 橘园绿肥种植对土壤氨氧化微生物群落α多样性的影响

Table 2 Effects of green manure planting on the α diversity of soil ammonia oxidation microbial communities in a citrus orchard					
氨氧化微生物 Ammonia-oxidizing microorganism	处理 Treatment	Ace	Chao	Simpson	Shannon
AOA	NG	85.60±17.31a	79.63±10.08a	0.39±0.24a	1.78±0.89a
	LP	54.01±2.05b	54.00±0.87b	0.16±0.01a	2.27±0.05a
	NL	53.05±5.91b	52.84±8.33b	0.18±0.01a	2.18±0.04a
AOB	NG	44.60±21.05a	44.33±20.98a	0.25±0.03a	1.76±0.07b
	LP	45.58±9.86a	43.42±9.59a	0.15±0.05b	2.33±0.17a
	NL	60.14±11.64a	55.75±10.15a	0.20±0.07ab	2.12±0.31ab

注:同列小写字母不同表示在不同绿肥种植下AOA或AOB的α多样性指数差异显著($P<0.05$)。
Note: different lowercase letters in the same column represent significant differences of α diversity indices at $P<0.05$ among different ground covers.

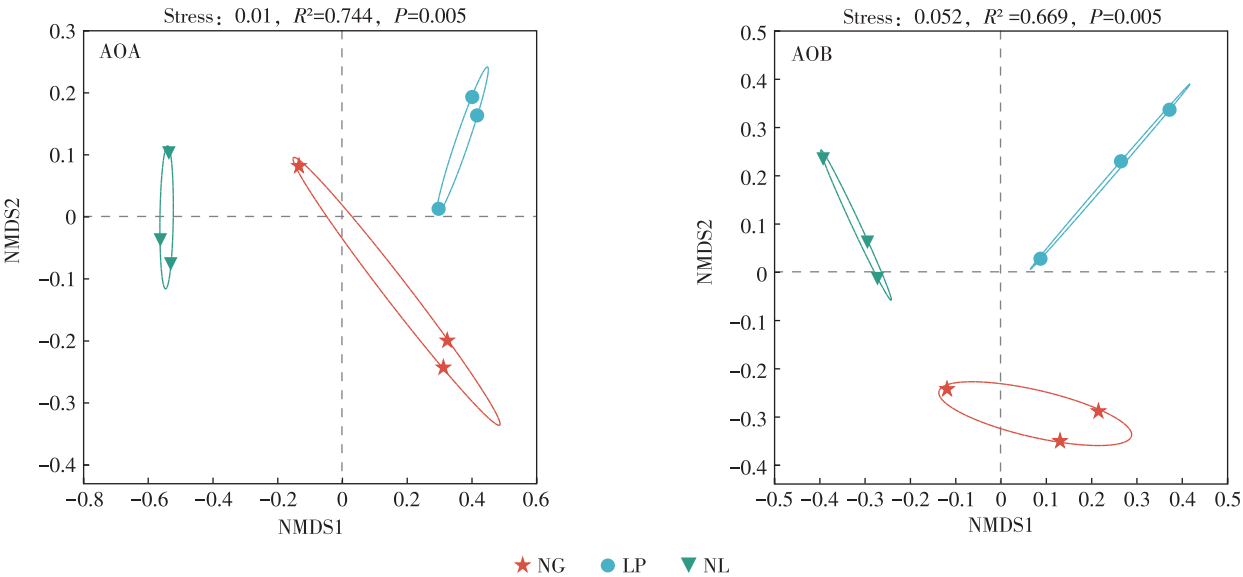


图2 橘园绿肥种植下土壤AOA和AOB微生物群落β多样性的NMDS分析

Figure 2 β diversity by NMDS of the OTUs of AOA and AOB microbial community in the citrus soil under different green manures planting

NL(图3 AOA)。AOA分类出的门主要有泉古菌门(Crenarchaeota)、奇古菌门(Thaumarchaea)和norank—Archaea,其中泉古菌门在橘园土壤中的相对丰度最高(图4),为55.32%~83.22%,但不同处理之间无显著性差异($P>0.05$);奇古菌门在LP中的相对丰度显著高于其他处理。AOA分类出的属主要有norank—Crenarchaeota、亚硝化球菌属(*Nitrososphaera*)和norank—Thaumarchaeota,其中norank—Crenarchaeota优势明显,在NG、LP和NL三个处理中的相对丰度分别为83.22%、71.18%和55.32%,且NG中显著高于LP、NL;奇古菌门的亚硝化球菌属在LP中的相对丰

度显著高于其他处理。

不同绿肥种植处理下AOB-*amoA*基因共获得142个OTU,共有的OTU数目为17个,占总OTU数目的11.97%,特有的OTU数目表现为NG>NL>LP(图3 AOB)。AOB的优势门是变形菌门(Proteobacteria),其在NG、LP和NL中的相对丰度分别为68.28%、90.74%和79.36%(图4),各处理间无显著差异($P>0.05$)。AOB分类出的属主要有亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)、亚硝化弧菌属(*Nitrosovibrio*)、亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*),其中亚硝化螺菌属为优势属,其在NG和LP中相对丰度分别为21.2%和45.87%,但在

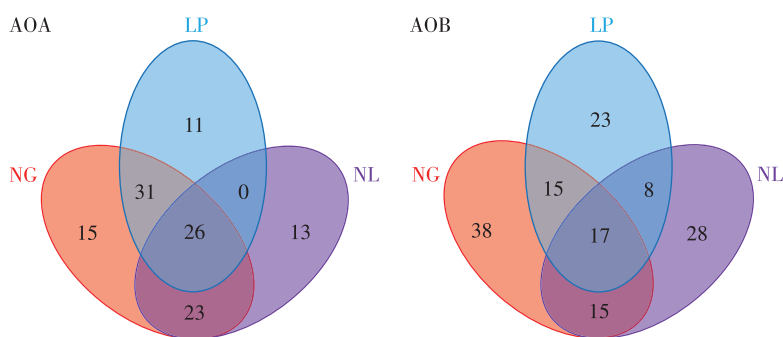


图3 橘园绿肥种植下土壤AOA和AOB的OTU组成的Venn图

Figure 3 Venn diagram of the OTUs of AOA and AOB in the citrus soil under green manure planting

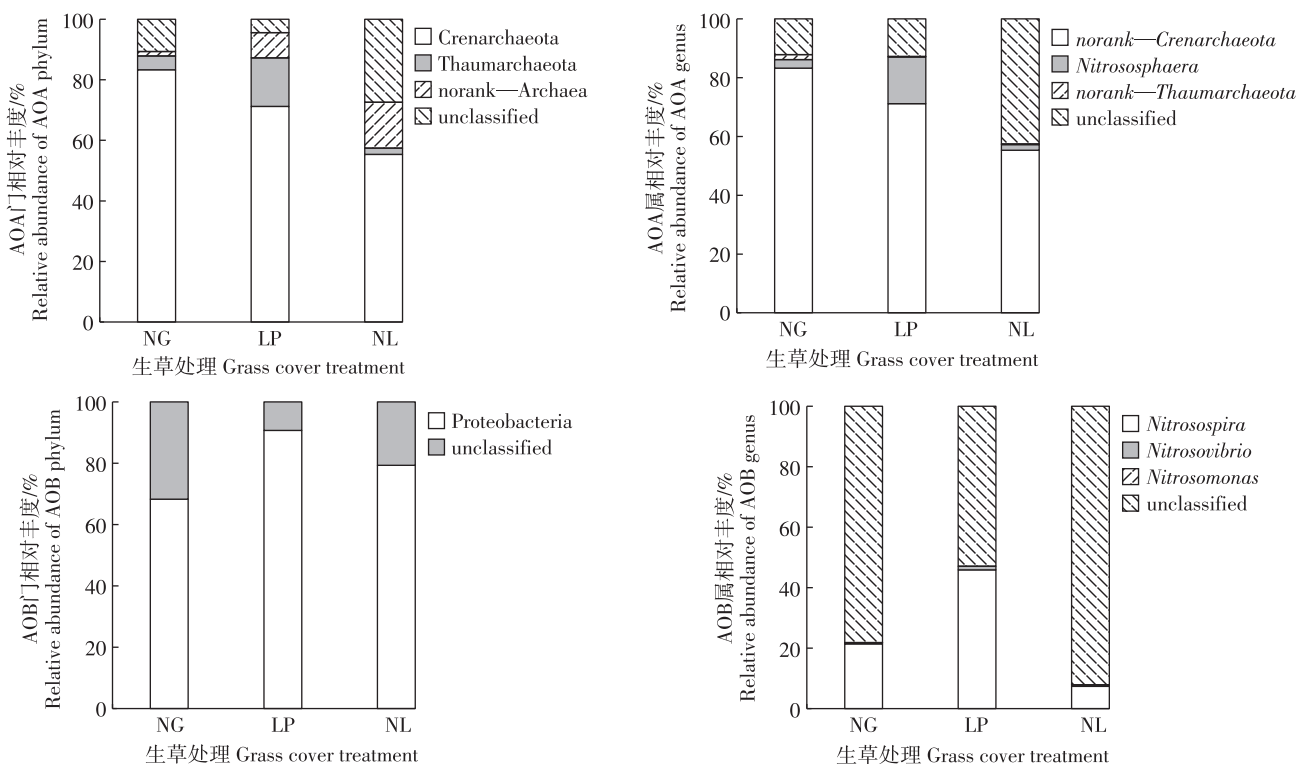


图4 橘园绿肥种植下土壤AOA门、属和AOB门、属的相对丰度

Figure 4 Relative abundances of phyla and genera of AOA and AOB in citrus soils under green manure planting

NL中仅有7%,显著低于NG和LP(图4)。可见,不同种绿肥处理均对土壤氨氧化微生物群落组成有显著影响,但不同种绿肥种植对不同的特定菌属影响差异较大。

2.4 影响橘园土壤氨氧化微生物群落变化的主要因素

将不同绿肥种植下土壤氨氧化微生物的丰度和多样性指数与各项植物和土壤因子进行 Mantel test 分析,结果如图5所示。AOA-*amoA* 基因丰度与 Cover、Height、Rp、SB、RB、RTN、TC、TN 等极显著相关($P<0.01$),与 Sp、Ep、RTN、AP、AK、MBC 等显著相关($P<0.05$);AOA 的多样性指数与诸多植物因子,如 Cover、Height、Rp、Sp、Ep、SB、RB、RTC、RTN 等,土壤因子如 SWC、TC、TN、AP 等显著相关($P<0.05$);AOA 的群落组成(门和属)与 Height、STN、TC、TN、NN 等显著相关($P<0.05$)。AOB-*amoA* 基因丰度与 Height、Rp、RB、RTC、RTN、pH、TC、TN、NN、AP 等显著相关($P<0.05$);AOB 的多样性指数与土壤 BD 显著相关($P<0.05$);AOB 的群落组成(门和属)与植物群落的 Ep、土壤的 pH、DOC、AN、TP 和 AK 呈显著相关关系($P<0.05$)。

从图5中还可看出环境因子的相关关系:植物因子,如 Cover 或 Height 与植物群落的植物生物量(SB、

RB)显著正相关,Cover 与植物多样性指数显著负相关,植物生物量与其碳氮含量(如 RTC、RTN)亦相关性明显。此外,土壤因子如 pH 与氮磷含量(如 AN、NN、AP)相关性显著($P<0.05$)。

RDA-HP 分别分析了氨氧化微生物 AOA 和 AOB 群落分布与植物和土壤因子的关系,由于 RDA 对环境因子数量的限制性,结合 Mantel test 分析进行筛选因子后,针对 AOA 和 AOB 群落的 RDA 模型均具有显著性($P<0.05$)。在分析影响 AOA 群落结构的 RDA 模型中,有 Height、RB、SWC、pH、AN、TC、TN 和 NN 等7个因子进入 RDA-HP 分析中,这些因子的总贡献率达99.3%,其中前两轴(RDA1 和 RDA2)的贡献率就达到了93.7%(图6 AOA)。这些因子中,SWC、pH 和 TN 对 AOA 的分布和数量均具有显著性影响($P<0.05$),其贡献率均超过17%;Thaumarchaeota、Nitrososphaera 主要受 pH 和 NN 的影响 norank—Thaumarchaeota 受 TN 和 SWC 影响较大,而 norank—Archaea 主要受 TC 和 RB 的影响。Ep、RB、pH、AN、NN 和 AP 等6个因子进入影响 AOA 群落结构的 RDA-HP 模型中,总贡献率达98.6%,其中,AP、NN 和 pH 对 AOB 的分布和数量具有显著影响($P<0.05$),贡献率分别为26.95%、

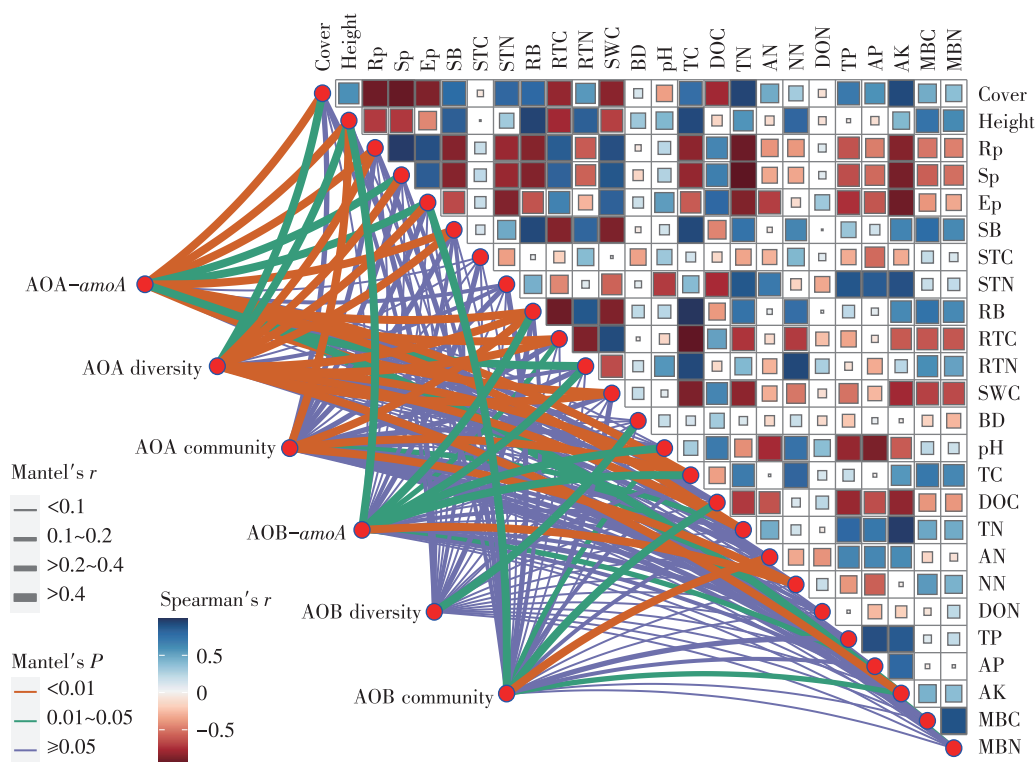
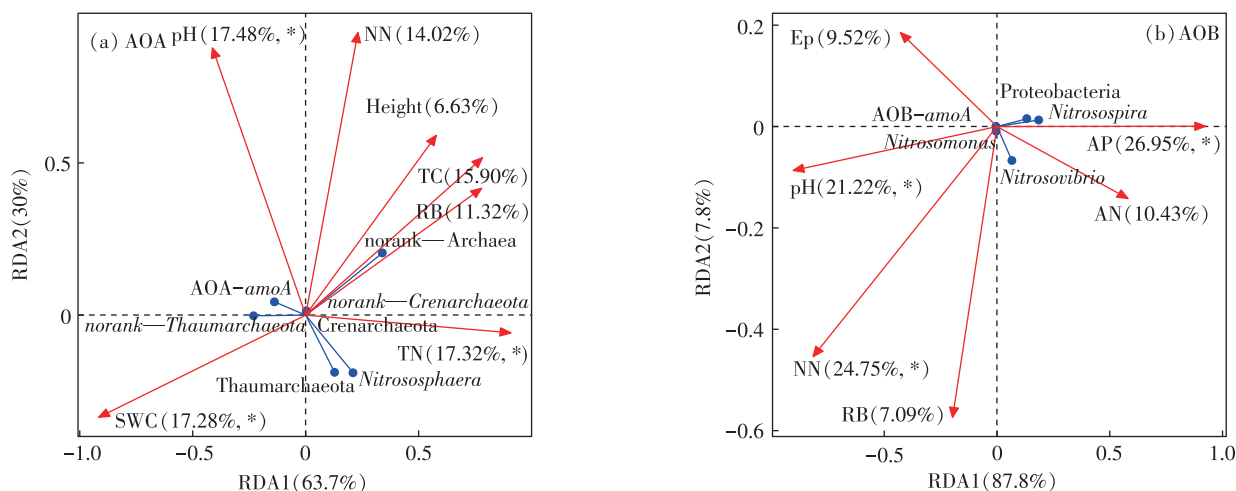


图5 Mantel 检验分析橘园绿肥种植下土壤和植物因子对氨氧化微生物群落结构的影响

Figure 5 Effects of plant community factors and soil properties on the structures of ammonium oxidizing microorganisms under green manure planting based on a Mantel test



括号中数值为因子的贡献率, * $P < 0.05$ 。

The value in the bracket represents the contribution of a specific factor to the model. * means $P < 0.05$.

图6 土壤氨氧化微生物 AOA 和 AOB 群落结构与植物和土壤因子的 RDA-HP 分析

Figure 6 Redundancy analysis with hierarchical partitioning for the community structure of AOA and AOB with plant and soil factors

24.75% 和 21.22%; Proteobacteria 和 *Nitrosospira* 受 pH 和 AP 的影响较大, RB、Ep 和 AN 对 *Nitrosovibrio* 的分布起主要作用。

3 讨论

3.1 种植绿肥种类对氨氧化微生物的影响

绿肥种植对于微生物多样性的影响依赖于植物凋落腐解物质的数量和质量、环境条件、土壤特性和植物类型的综合作用^[35]。不同植物种类会通过其有机质的输入、对硝化潜势和土壤环境因子的影响,改变氨氧化微生物的多样性和群落组成^[36]。不同绿肥种类的种植也导致了植物输入不同,其对土壤养分的影响不同,从而对 AOA 和 AOB 的丰度产生不同影响^[37]。本研究,含豆科绿肥的种植显著增加了植物的高度和地上及地下植物生物量,且土壤 TC、TN 含量显著高于 NG。NL 中,除了豆科绿肥外,还有多种自然生草的存在,植物群落物种多样性和生物量高,增加了有机质向土壤的输入,从而使得其氨氧化微生物的丰度较高。此外, NL 含有豆科绿肥,其自身氮含量充足,较其他植物种类的氮含量高(如 STN 和 RTN),刈割还田后提供了土壤更多的有效态氮^[38],底物充足是影响 AOA 和 AOB 数量和多样性的一个关键因素。豆科绿肥的根系分泌物和根瘤也会对微生物产生一定的影响,它们自身的固氮作用会导致吸收土壤中速效的铵态氮减少,并向土壤中释放更稳定的有机氮素,因此,豆科绿肥对土壤氨氧化微生物作用的

影响不同于其他有机肥和无机氮肥^[39]。

3.2 影响氨氧化微生物的植物和土壤因素

果园绿肥种植能有效改善园区地温和气温,提高土壤保水能力,改善土壤理化性质,影响土壤微生物的生长条件。氨氧化微生物 AOA 和 AOB 有着不同的生态位,环境因子的变化,如植被、pH、有机质含量、AN 的可利用性等对不同氨氧化微生物类群有特异的选择性^[39-40]。本研究中,影响 AOA 和 AOB 群落组成、丰度和多样性的植物因素主要有植物群落的盖度、高度、物种多样性、地上生物量和地下生物量、植株的碳氮含量等,这些植物因素均会显著影响凋落腐解物质的数量和质量、根系分泌物的种类和含量,从而影响到土壤中输入的碳源和氮源,进而改变 AOA 和 AOB 的类群和数量。

在土壤因素中,有研究表明,当 $\text{pH} < 6.2$, NH_3 会转化成 NH_4^+-N , 导致反应底物减少, AOB 类微生物的代谢活性会降低,生长会受到抑制^[41]。试验柑橘园地处湖北宜昌,试验前长期过量施肥,土壤酸化较严重,本研究中土壤 pH 值为 5.63~6.66, 其中 NG 和 LP 处理的土壤 pH 低于 6, AOA 占优势,这与其他研究中的酸性土壤中 AOA 占优势地位的研究结果一致^[42], 而 NL 处理的 pH 超过 6.2, AOB 则成为了优势菌群。另外,大量研究证明,氨氧化微生物的群落结构与土壤理化性质直接相关^[43], AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因对施肥等环境因子较其他功能基因更具敏感性^[44]。相对于 AOB, AOA 偏向于含氧量较低的环境,并对土壤板结

的环境有更强的适应性,因此AOA比AOB可能更适应于受人为干扰较大的橘园土壤环境。此外,SWC会通过影响土壤的通气性,改变有机氮的矿化强度,影响反应底物含量来影响土壤硝化作用^[45];TP或AP是评价土壤肥力的重要指标,会对氨氧化微生物的丰度产生影响^[46];AN是橘园土壤有效态氮的主要类型,在氨氧化过程中作为底物会被氨氧化微生物消耗一部分,而NN作为硝化作用的主要产物,含量会随着硝化作用的增强而增加;这些因素都对AOA或AOB的丰度和群落结构产生了影响。

尽管不同绿肥种植处理间土壤氨氧化微生物的 α 多样性仅部分指数表现出显著性差异,但总体上AOA的多样性要高于AOB,这是因为AOB主要集中在*Nitrosospira*、*Nitrosovibrio*、*Nitrosomona*等几个属,而AOA的多样性和栖居范围都会胜于AOB^[40]。AOA的*amoA*基因丰度和多样性指数与植物群落的高度、盖度、生物量,以及土壤SWC、TC、TN等密切相关,主要门属的分布受SWC、pH和TN的显著影响(合计贡献率>50%);而AOB的*amoA*基因丰度和多样性指数与植物群落的高度、生物量以及土壤的pH、TC、NN和AP等显著相关,主要门属分布受pH、NN和AP的显著影响(合计贡献率>70%)。这些结果表明,植物和土壤因素共同影响着氨氧化微生物AOA和AOB的种类和分布^[47],且土壤因素比植物因素的贡献更大。本研究中,不同绿肥种植的橘园土壤中AOA的优势菌属有*Nitrososphaera*,AOB的优势菌为*Nitrosospira*,这与很多土壤环境中相似,如*Nitrososphaera*是高氮环境中AOA的优势菌属,在相对低氮的环境中AOB的优势菌属为*Nitrosospira*^[48]。作为AOA和AOB的优势菌,*Nitrososphaera*和*Nitrosospira*的分布与AOA和AOB的群落结构分布有一致的规律^[49]。本研究中,这两类菌属均偏好AN和AP较高的环境,说明养分较高的环境更适合它们生长。

4 结论

(1)相比于自然生草,人工种植绿肥的AOA数量均显著降低,但光叶苕子混播于自然生草的模式极大增加了AOB数量,从而使得该处理中氨氧化微生物的丰度显著高于自然生草或单独种植光叶苕子处理。

(2)3种绿肥种植对氨氧化微生物群落的 α 多样性影响较小,但 β 多样性差异明显;AOA多样性与植物的盖度、高度、物种多样性、地上生物量和地下生物量、根系碳氮含量,以及土壤的含水量、总碳含量和总

氮含量、速效磷含量等显著相关,AOB多样性与土壤容重显著相关。

(3)3种绿肥种植处理下AOA的优势门和属分别是泉古菌门和*norank—Crenarchaeota*,土壤含水量、pH和总氮含量对AOA主要类群的分布和数量具有显著性影响;AOB的优势门和属分别是变形菌门和亚硝化螺菌属,其中亚硝化螺菌属的相对丰度在不同处理中有显著差异;土壤速效磷、硝态氮含量和pH对AOB主要类群的分布和数量具有显著影响。

(4)果园种植绿肥可改变土壤理化性质从而使土壤中氨氧化微生物的数量和种类发生变化,保留行间自然生草,并于其中种植豆科绿肥可以促进土壤硝化作用和改善果园生态环境。

参考文献:

- [1] 高登涛,郭景南,魏志峰,等. 果园地面覆盖对土壤质量和苹果生长发育的影响[J]. 果树学报, 2010, 27(5): 770-777. GAO D T, GUO J N, WEI Z F, et al. Effect of orchard mulch on soil quality, growth and development of apple trees[J]. *Journal of Fruit Science*, 2010, 27(5): 770-777.
- [2] 董海强,李丙智,王金锋,等. 不同覆盖方式对苹果树体生长及土壤理化特性的影响[J]. 西北农业学报, 2015, 24(8): 101-109. DONG H Q, LI B Z, WANG J F, et al. Effects of different mulching patterns on growth of apple trees and soil physicochemical properties[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2015, 24(8): 101-109.
- [3] 寇建村,杨文权,韩明玉,等. 我国果园生草研究进展[J]. 草业科学, 2010, 27(7): 153-159. KOU J C, YANG W Q, HAN M Y, et al. Research progress on interplanting grass in orchard in China[J]. *Pratacultural Science*, 2010, 27(7): 153-159.
- [4] 丁大群. 浅析绿肥种植对土壤的改良与应用[J]. 农业与技术, 2019, 39(4): 14-15. DING D Q. Analysis on the improvement and application of green fertilizer planting to soil[J]. *Agriculture and Technology*, 2019, 39(4): 14-15.
- [5] 高玲,刘国道. 绿肥对土壤的改良作用研究进展[J]. 北京农业, 2007(36): 29-33. GAO L, LIU G D. Progress of green manure in soil improvement[J]. *Beijing Agriculture*, 2007(36): 29-33.
- [6] 庄朱力. 经济绿肥生态果园利用模式的应用推广[J]. 福建农业, 2004(10): 10. ZHUANG Z L. Application and promotion of economic green manure ecological orchard utilization mode[J]. *Fujian Agriculture*, 2004(10): 10.
- [7] 郝保平,张鑫,张延芳,等. 对山西省发展果园绿肥的思考与建议[J]. 山西农业科学, 2017, 45(7): 1193-1196. HAO B P, ZHANG X, ZHANG Y F, et al. Thoughts and suggestions on developing orchard green manure[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2017, 45(7): 1193-1196.
- [8] 白岗栓,郑锁林,邹超煜,等. 陇东旱塬果园生草对土壤水分及苹果树生长的影响[J]. 草地学报, 2018, 26(1): 173-183. BAI G S, ZHENG S L, ZOU C Y, et al. Influence of interplant herbage on soil

- moisture and apple tree growth in dry plateau of Eastern Gansu[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2018, 26(1):173-183.
- [9] 杜毅飞, 方凯凯, 王志康, 等. 生草果园土壤微生物群落的碳源利用特征[J]. 环境科学, 2015, 36(11):4260-4267. DU Y F, FANG K K, WANG Z K, et al. Carbon source utilization characteristics of soil microbial community for apple orchard with interplanting herbage[J]. *Environmental Science*, 2015, 36(11):4260-4267.
- [10] 刘天琳, 王智慧, 闫小娟, 等. 稳定性同位素 DNA-SIP 示踪中性紫色土的氨氧化过程[J]. 环境科学, 2019, 40(6):2930-2938. LIU T L, WANG Z H, YAN X J, et al. Ammonia oxidation in a neutral purple soil measured by the ^{13}C -DNA-SIP method[J]. *Environmental Science*, 2019, 40(6):2930-2938.
- [11] 王莹燕, 熊子怡, 罗东海, 等. 化肥减量配施有机肥对土壤功能微生物和柠檬产量及品质的影响[J]. 环境科学, 2023, 44(3):1768-1779. WANG Y Y, XIONG Z Y, LUO D H, et al. Effects of chemical fertilizer reduction substitute with organic fertilizer on soil functional microbes and lemon yield and quality[J]. *Environmental Science*, 2023, 44(3):1768-1779.
- [12] 魏树伟, 王少敏, 张勇, 等. 不同土壤管理方式对梨园土壤养分、酶活性及果实风味品质的影响[J]. 草业学报, 2015, 24(12):46-55. WEI S W, WANG S M, ZHANG Y, et al. Effects of different soil management methods on the soil nutrients, enzyme activity and fruit quality of pear orchards[J]. *Acta Pratacul Sinica*, 2015, 24(12):46-55.
- [13] LUCE M S, ZIADI N, GAGNON B, et al. Prediction of total carbon, total nitrogen, and pH of organic materials using visible near-infrared reflectance spectroscopy[J]. *Canadian Journal of Soil Science*, 2018, 98(1):175-179.
- [14] 李琳, 向丹, 武亚芬, 等. 长期不同施肥方式对日光温室番茄土壤养分和微生物群落结构的影响[J]. 应用生态学报, 2022, 33(2):415-422. LI L, XIANG D, WU Y F, et al. Effects of long-term different fertilization patterns on soil nutrients and microbial community structure of tomato in a solar greenhouse[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2022, 33(2):415-422.
- [15] 马阳, 吴敏, 王艳群, 等. 不同耕作施肥方式对夏玉米氮素利用及土壤容重的影响[J]. 水土保持学报, 2019, 33(5):171-176. MA Y, WU M, WANG Y Q, et al. Effects of different tillage and fertilization methods on nitrogen utilization and soil bulk density of summer maize[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2019, 33(5):171-176.
- [16] 赵官成, 梁健, 淡静雅, 等. 土壤微生物与植物关系研究进展[J]. 西南林业大学学报, 2011, 31(1):83-88. ZHAO G C, LIANG J, DAN J Y, et al. Review of studies on relationship between soil microbes and plants[J]. *Journal of Southwest Forestry University*, 2011, 31(1):83-88.
- [17] 赵彤, 蒋跃利, 闫浩, 等. 黄土丘陵区不同坡向对土壤微生物生物量和可溶性有机碳的影响[J]. 环境科学, 2013, 34(8):3223-3230. ZHAO T, JIANG Y L, YAN H, et al. Effects of different aspects on soil microbial biomass and dissolved organic carbon of the Loess Hilly Area[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(8):3223-3230.
- [18] 周慧, 史海滨, 张文聪, 等. 有机无机肥配施对盐渍化土壤微生物量和呼吸的影响[J]. 农业工程学报, 2021, 37(15):86-95. ZHOU H, SHI H B, ZHANG W C, et al. Effects of the combined application of organic and inorganic fertilizers on soil microbial biomass and soil respiration in saline soil[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2021, 37(15):86-95.
- [19] 冯俊喜, 王树声, 石屹, 等. 山东烟区不同种植模式土壤微生物群落特征研究[J]. 中国烟草科学, 2011, 32(2):38-42. FENG J X, WANG S S, SHI Y, et al. Characteristics of soil microbial community under different cropping systems in flue-cured tobacco growing areas of Shandong Province[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2011, 32(2):38-42.
- [20] 高嵩涓, 曹卫东, 白金顺, 等. 长期冬种绿肥改变红壤稻田土壤微生物生物量特性[J]. 土壤学报, 2015, 52(4):902-910. GAO S J, CAO W D, BAI J S, et al. Long-term application winter green manures changed the soil microbial biomass properties in red paddy soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52(4):902-910.
- [21] WU Y P, WANG X, HU R H, et al. Responses of soil microbial traits to ground cover in citrus orchards in central China[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(12):9122507.
- [22] 郭嘉华, 庞惠, 卓义, 等. 植被退化对温带典型草原根系-土壤系统碳氮分配的影响[J]. 生态学报, 2018, 38(15):5340-5350. GUO J H, PANG H, ZHUO Y, et al. Effects of vegetation degradation on carbon and nitrogen distribution of roots-soil system in temperate typical steppe[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(15):5340-5350.
- [23] 吴红敏, 杨清培, 曾娇, 等. 不同生草间作处理对柑橘园温度及产量的影响[J]. 江西农业大学学报, 2015, 37(2):239-248. WU H M, YANG Q P, ZENG J, et al. Effects of different grass intercropping treatments on citrus orchard temperature and yield[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2015, 37(2):239-248.
- [24] VANCE E D, BROOKES P C, JENKINSON D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1987, 19(6):703-707.
- [25] 鲍士旦. 土壤农化分析(第三版)[M]. 北京:中国农业出版社, 2000:25-106. BAO S D. Soil and agricultural chemistry analysis [M]. 3rd Edition. Beijing:China Agricultural Press, 2000:25-106.
- [26] EILERS K G, LAUBER C L, KNIGHT R, et al. Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(6):896-903.
- [27] 张雅丽, 郭晓明, 胡慧, 等. 牛粪还田对土壤微生物群落特征的影响[J]. 环境科学, 2023, 44(3):1792-1800. ZHANG Y L, GUO X M, HU H, et al. Effects of cow manure application on soil microbial community in farmland[J]. *Environmental Science*, 2023, 44(3):1792-1800.
- [28] XUN W, LI W, HUANG T, et al. Long-term agronomic practices alter the composition of asymbiotic diazotrophic bacterial community and their nitrogen fixation genes in an acidic red soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2018, 54(3):329-339.
- [29] ROUSK J, BÅÅTH E, BROOKES P C, et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil[J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(10):1340-1351.
- [30] MEL'NIKOVA N N, BULAVENKO L V, KURDISH I K, et al. Forma-

- tion and function of the legume-rhizobium symbiosis of soybean plants while introducing bacterial strains from the genera *Azotobacter* and *Bacillus*[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2002, 38(4): 368–372.
- [31] 陈水飞, 李垚, 葛晓敏, 等. 浙江仙居典型中亚热带常绿阔叶林样地的群落特征[J]. *生态与农村环境学报*, 2017, 33(12): 1109–1116. CHEN S F, LI Y, GE X M, et al. Community characteristics of a subtropical evergreen broad-leaved forest plot typical of Xianju of Zhejiang Province, Eastern China[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2017, 33(12): 1109–1116.
- [32] CHEN Y, XU Z, HU H, et al. Responses of ammonia-oxidizing bacteria and archaea to nitrogen fertilization and precipitation increment in a typical temperate steppe in Inner Mongolia[J]. *Applied Soil Ecology*, 2013, 68: 36–45.
- [33] 刘尧, 于馨, 于洋, 等. R 程序包“rdacca.hp”在生态学数据分析中的应用: 案例与进展[J]. *植物生态学报*, 2023, 47(1): 134–144. LIU Y, YU X, YU Y, et al. Application of “rdacca.hp” R package in ecological data analysis: case and progress[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2023, 47(1): 134–144.
- [34] LAI J S, ZOU Y, ZHANG J L, et al. Generalizing hierarchical and variation partitioning in multiple regression and canonical analyses using the rdacca.hp R package[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2022, 13: 782–788.
- [35] MIRZA B S, POTISAP C, NÜSSEIN K, et al. Response of free-living nitrogen-fixing microorganisms to land use change in the Amazon Rainforest[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(1): 281–288.
- [36] RUTIGLIANO F A, D’ASCOLI R, VIRZO DE SANTO A. Soil microbial metabolism and nutrient status in a Mediterranean area as affected by plant cover[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(11): 1719–1729.
- [37] MENDUM T A, HIRSCH P R. Changes in the population structure of β -group autotrophic ammonia oxidising bacteria in arable soils in response to agricultural practice[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34(10): 1479–1485.
- [38] JURAEVA D, GEORGE E, DAVRANOV K, et al. Detection and quantification of the *niH* gene in shoot and root of cucumber plants [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2006, 52(8): 731–739.
- [39] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展[J]. *生态学报*, 2009, 29(1): 406–415. HE J Z, ZHANG L M. Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(1): 406–415.
- [40] BURTON S A Q, PROSSER J I. Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 29–52.
- [41] VERHAMME D T, PROSSER J I, NICOL G W. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(6): 1067–1071.
- [42] 杨亚东, 宋润科, 赵杰, 等. 长期不同施肥制度对水稻土氨氧化微生物数量和群落结构的影响[J]. *应用生态学报*, 2018, 29(11): 3829–3837. YANG Y D, SONG R K, ZHAO J, et al. Effects of long-term different fertilization regimes on the abundance and community structure of ammonia oxidizers in paddy soils[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, 29(11): 3829–3837.
- [43] AGEHARA S, WARNCKE D D. Soil moisture and temperature effects on nitrogen release from organic nitrogen sources[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2005, 69(6): 1844–1855.
- [44] 王宇峰, 孟会生, 李廷亮, 等. 培肥措施对复垦土壤微生物碳氮代谢功能多样性的影响[J]. *农业工程学报*, 2020, 36(24): 81–90. WANG Y F, MENG H S, LI T L, et al. Effects of fertilization regime on the functional diversity of microbial carbon and nitrogen metabolism in reclaimed soil[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2020, 36(24): 81–90.
- [45] 程琳. 不同荒漠草原和主要植物根际土壤细菌多样性研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2017. CHENG L. Study on bacterial diversity of vegetation rhizosphere soil in different desert grassland areas[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2017.
- [46] WANG C, ZHENG M, SONG W, 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.
- [47] PEREIRA E, SILVA M C, SEMENOV A V, et al. Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2011, 77(1): 57–68.
- [48] BURGESS B K, LOWE D J. Mechanism of molybdenum nitrogenase [J]. *Chemical Reviews*, 1996, 96(7): 2983–3012.
- [49] 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[J]. *土壤*, 2021, 53(1): 13–20. LI W X, ZHENG M M, WANG C, et al. *Nitrososphaera* may be a major driver of nitrification in acidic soils[J]. *Soils*, 2021, 53(1): 13–20.

(责任编辑:叶飞)