

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第38卷 第8期

Vol.38 No.8

2017

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

用于滤膜称重的饱和氯化镁溶液恒湿系统搭建与评估 李晓晓,张强,邓建国,蒋靖坤,郝吉明(3095)

钢铁工业排放颗粒物中碳组成的特征 张进生,吴建会,马威,冯银厂(3102)

常州市大气 PM_{2.5} 中 PAHs 污染特征及来源解析 顾爱军,刘佳澍,罗世鹏,毕承路,苏亚兰,叶招莲,盖鑫磊(3110)

兰州河谷盆地大气多环芳烃干沉降通量及来源 剧媛丽,刘攀亮,于周锁,高宏,毛潇萱,马建民,黄韬(3120)

株洲市大气降尘中元素特征及来源分析 王世豪,张凯,柴发合,钟学才,周广柱,杨晴,柯馨姝(3130)

传统北京烤鸭烤制过程中大气污染物的排放特征 徐敏,何万清,聂磊,韩力慧,潘涛,石爱军(3139)

基于车载测试的重型柴油车尾气典型烷烃排放特征 史纯珍,郝雪薇,申现宝,曹鑫悦,张伟,吴辉,姚志良(3146)

基于 wavelet-SVM 的 PM₁₀ 浓度时序数据预测 王平,张红,秦作栋,姚清晨,耿红(3153)

广州港船舶停泊工况排放因子实测及排放量初步估算 黄学良,张洲,杨威强,李晟,朱明,方华,何俊杰,陈俊文,万承浩,张艳利,刘国光,黄祖照,王宇骏,王新明(3162)

沙尘天气对生物气溶胶中总微生物浓度及粒径分布的影响 李鸿涛,祁建华,董立杰,高冬梅(3169)

典型生活垃圾处理设施恶臭排放特征及污染评价 芦会杰(3178)

杭州地区城区降雪中全氟化合物的污染特征 张明,唐访良,俞雅雯,徐建芬,陈金汉,余波,周姗,张伟(3185)

黄浦江流域典型污水中不同粒径胶体的三维荧光光谱特征 聂明华,晏彩霞,杨毅,周俊良,刘敏(3192)

漓江地表水体有机碳来源 赵海娟,肖琼,吴夏,刘凡,苗迎,蒋勇军(3200)

夏季热分层效应对典型岩溶水库水化学及溶解无机碳的影响 吴飞红,蒲俊兵,李建鸿,张陶,李丽,黄思宇(3209)

城市不同功能区地表水重金属污染特性比较:以宁波为例 徐美娟,童桂华,孙丹,李建新,虞效益(3218)

地下水主要组分水化学异常识别方法对比:以柳江盆地为例 张小文,何江涛,彭聪,张昌延,倪泽华(3225)

人为扰动背景下城郊溪流底质磷的生物-非生物吸收潜力分析 李如忠,叶舟,高苏蒂,郑悦(3235)

长江口低氧区沉积物中磷的形态及其环境意义 刘军,臧家业,冉祥滨,赵晨英,刘季花,王小静(3243)

三峡库区小流域不同土地利用类型“土壤-水体”氮磷含量特征及其相互关系 陈成龙,高明,木志坚,倪九派,祁乐(3254)

黄土高原降雨驱动下流域碳输移特征及其碳流失评估:以羊圈沟坝系流域为例 鄂馨卉,汪亚峰,高扬,陈利顶,陈世博,陈维梁(3264)

新型溴代苯酚类消毒副产物的氯化降解机制 李欢,李正魁,李爱民,周庆,王莹,潘咏(3273)

藻形态及混凝剂组成对混凝-超滤过程的影响 张大为,徐慧,王希,门彬,王东升,段晋明(3281)

汝溪河浮游硅藻功能群特征及其与环境因子相关性分析 向蓉,李巧玉,喻毅,张洪波,董聪聪,施军琼,吴忠兴(3290)

石岩水库叶绿素 a 时空分布及其影响因子分析 宋云龙,张金松,郭小雅,朱佳,王丽,陶益,张丽(3302)

不同湿地模型中根系微生物的多样性 王林,李冰,余家辉,朱加宾,朱健(3312)

北海湖微生物群落结构随季节变化特征 张雅洁,李珂,朱浩然,张洪勋(3319)

基于高通量测序的流化床生物滤器细菌群落结构分析 张海耿,宋红桥,顾川川,单建军,张宇雷,倪琦(3330)

高效反硝化菌和包埋填料性能及微生物群落分析 孟婷,杨宏(3339)

基于城市污水资源化的微藻筛选与污水预处理 韩松芳,金文标,涂仁杰,陈洪一(3347)

生物膜贴壁培养小球藻净化猪粪沼液废水的效果 王愿珠,程鹏飞,刘德富,刘天中(3354)

微气泡臭氧催化氧化-生化耦合工艺深度处理煤化工废水 刘春,周洪政,张静,陈晓轩,张磊,郭延凯(3362)

pH 冲击对海洋厌氧氨氧化菌处理含海水污水脱氮效能的影响 于德爽,周同,李津,王晓霞,吴国栋,王晓静(3369)

酒精废水部分亚硝化-厌氧氨氧化脱氮的可行性 周正,林兴,王凡,顾澄伟,沈婧,袁砚,金润(3377)

模拟废水中钼的微生物回收及其对亚甲基蓝的催化特性 康乃馨,朱能武,郭雯颖,何志心(3385)

采用颜色空间表征 ANAMMOX 启动与冲击过程 王利君,李志华,韩冬,张天宇,杨成建(3393)

CSTR 和 MBR 反应器的短程硝化快速启动 张婷,吴鹏,沈耀良,闫刚,徐乐中, Samwine Thomas(3399)

硫酸盐还原氨氧化体系中基质转化途径 完颜德卿,黄勇,毕贞,刘忻,姚鹏程,张文静(3406)

不同 TOC/NH₄⁺-N 对厌氧氨氧化脱氮效能的影响 王凡,刘凯,林兴,周正,李祥,黄勇(3415)

盐度对 EGSB 反应器的运行及厌氧颗粒污泥的影响 谭潇,黄靓,杨平,涂弈州(3422)

CANON 颗粒污泥工艺的启动与负荷提高策略 孙延芳,韩晓宇,张树军,李星,曹相生(3429)

胞外聚合物对活性污泥吸附去除全氟辛烷磺酸(PFOS)的影响 刘鑫彤,尹华,彭辉,李浩榕,杨萍萍,曹雅娟(3435)

不同施肥方式下紫色土 N₂O 与 NO_x 的排放特征 胡磊,刘韵,朱波(3442)

地膜覆盖对蔬菜地甲烷排放的影响 张凯莉,郝庆菊,冯迪,石将来,石孝均,江长胜(3451)

模拟的增温增雨对内蒙古温带草原土壤氨氧化微生物的影响 张翠景,沈菊培,孙翼飞,王军涛,杨中领,韩红艳,张丽梅,万师强,贺正(3463)

长期施肥酸性旱地土壤硝化活性及自养硝化微生物特征 徐白璐,钟文辉,黄欠如,秦红益,邓欢,韩成(3473)

施加碳酸钙对酸性土壤微生物氮循环的影响 郭安宁,段桂兰,赵中秋,唐仲,王杨扬,王伯勋(3483)

水稻不同生育期根际与非根际土壤胞外酶对施氮的响应 魏亮,汤珍珠,祝贞科,蔡观,葛体达,王久荣,吴金水(3489)

凋落物呼吸温度敏感性的变化特征及其影响因素 张彦军(3497)

西北干旱区农田土壤磁性特征及其环境意义 王新,夏敦胜,王博,陈红,刘浩(3507)

小麦秸秆驱动菱铁矿热解制备磁性生物炭及其吸附 Cd²⁺ 活性 张如玉,刘海波,邹雪华,庆承松,李梦雪,陈冬,陈天虎(3519)

交通污染暴露对 DNA 甲基化的影响 汪婷,丁锐,黄丹妮,祝子逸,章军,叶怀庄,徐迎春,金永堂(3529)

外接菌种对污泥堆肥效能及堆体细菌群落的影响 杨萍萍,尹华,彭辉,唐少宇,卢妙,刘皓(3536)

中国电动自行车动力铅酸蓄电池生命周期评价 刘巍,田金平,陈吕军(3544)

《环境科学》征稿简则(3280) 《环境科学》征订启事(3301) 信息(3353, 3472, 3535)

长期施肥酸性旱地土壤硝化活性及自养硝化微生物特征

徐白璐^{1,2}, 钟文辉¹, 黄欠如³, 秦红益¹, 邓欢^{1,2}, 韩成^{1*}

(1. 南京师范大学地理科学学院, 江苏省物质循环与污染控制重点实验室, 南京 210023; 2. 南京师范大学环境学院, 南京 210023; 3. 江西省红壤研究所, 南昌 331717)

摘要: 构建微域培养结合梯度凝胶电泳 (DGGE)、Illumina MiSeq 高通量测序、生物信息学分析等分子生态学技术, 以不施肥土壤为对照 (CK), 研究长期施化肥 (NPK) 和有机肥 (OM) 对酸性旱地土壤硝化活性及自养硝化微生物群落的影响, 并认知其与土壤理化因子间的关系. 结果表明, 施化肥和有机肥显著提高土壤有机碳和无机氮含量, 施有机肥提高土壤 pH 和总氮含量、降低 C/N; 供试土壤自养硝化作用占据主导 (73.60% ~ 85.32%), 施肥显著提升土壤自养硝化活性, 且施有机肥提升效果更为明显; 微域培养后, OM 土壤氨氧化古菌 (AOA) 和细菌 (AOB) *amoA* 基因绝对丰度及 16S rRNA 基因相对丰度显著上升, 而 CK 和 NPK 土壤仅 AOA 相对丰度显著上升, 即 3 种土壤 AOA 均有明显活性 (主要类群为 *Nitrososphaera*, >99.30%), 而 AOB 仅在 OM 土壤有活性 (主要类群为 *Nitrosospira*, >99.99%), 另外还发现 OM 土壤中亚硝酸盐氧化细菌 (NOB) 有较强活性 (主要类群为 *Nitrospira*, >96.69%); 逐步回归分析显示自养硝化活性显著受总氮含量影响, AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度分别受有机碳含量和 pH 影响, *Nitrososphaera* 相对丰度与 NO_3^- -N 含量显著正相关, 而 *Nitrosospira* 和 *Nitrospira* 相对丰度则与 C/N 显著负相关. 可见, 长期施肥后土壤总氮含量的提升显著刺激自养硝化活性; 以 *Nitrososphaera* 为主的 AOA 在酸性旱地土壤硝化作用中发挥了重要作用, 施有机肥土壤 pH 上升及 C/N 下降刺激了 *Nitrosospira* (AOB) 生长, 从而改变了酸性旱地土壤中活跃的自养硝化微生物类群.

关键词: 酸性旱地土壤; 施肥; 氨氧化微生物; Illumina MiSeq 测序; 生物信息学分析

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2017)08-3473-10 DOI: 10.13227/j.hjxx.201701064

Nitrification Activity and Autotrophic Nitrifiers in Long-term Fertilized Acidic Upland Soils

XU Bai-lu^{1,2}, ZHONG Wen-hui¹, HUANG Qian-ru³, QIN Hong-yi¹, DENG Huan^{1,2}, HAN Cheng^{1*}

(1. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Materials Cycling and Pollution Control, School of Geography Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 2. School of Environmental Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 3. Jiangxi Institute of Red Soil, Nanchang 331717, China)

Abstract: Soil microcosm incubation, molecular ecology techniques including denaturing gradient gel electrophoresis and Illumina MiSeq high-throughput sequencing, and bioinformatics analysis were carried out to investigate the effect of long-term fertilization with chemical fertilizers (NPK) and organic manure (OM) on soil nitrification activity and the autotrophic nitrifying communities in acidic upland soils. No fertilization soil (CK) was the control. Relationships between soil nitrification activities, autotrophic nitrifying communities, and soil characteristics were further evaluated. Long-term fertilization significantly increased the soil organic carbon and inorganic nitrogen contents. Fertilization with organic manure significantly increased soil pH and total nitrogen contents, but decreased soil C/N. Autotrophic nitrification dominated soil nitrification, and accounted for 73.60% -85.32% of total nitrification. Fertilization significantly increased soil autotrophic nitrification activity and the highest value was observed in the OM soil. During the microcosm incubation, the absolute abundances of *amoA* genes and the relative abundances of 16S rRNA genes of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in the OM soil significantly increased. The relative abundances of 16S rRNA genes of the AOA greatly increased in both CK and NPK soils. These results suggested the remarkable activity of AOA in the three soils (the predominant population was *Nitrososphaera*, >99.30%) and implied that AOB was active in the OM soil (the predominant population was *Nitrosospira*, >99.99%). We also found the activity of nitrite-oxidizing bacteria (NOB) in the OM soil, and the predominant population was *Nitrospira* (>96.69%). Stepwise regression analysis demonstrated that soil autotrophic nitrification activity was significantly affected by soil total nitrogen content, whereas the abundances of archaeal and bacterial *amoA* genes were significantly affected by soil organic carbon content and soil pH, respectively. We also found significant positive correlation between the relative abundance of *Nitrososphaera* and soil nitrate content and a negative correlation between the relative abundance of *Nitrosospira* and *Nitrospira* with soil C/N. Overall, our results showed that long-term fertilization greatly increased soil nitrification activity and altered

收稿日期: 2017-01-09; 修订日期: 2017-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41401293, 41271255); 江苏省自然科学基金项目 (BK20141051); 国家重点研发计划项目 (2016YFD0200302); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 徐白璐 (1992 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤氮循环功能微生物, E-mail: 141302141@stu.njnu.edu.cn

* 通信作者, E-mail: chenghan@njnu.edu.cn

the autotrophic nitrifying communities in acidic upland soils. Soil autotrophic nitrification activity was significantly stimulated by soil total nitrogen content. The *Nitrososphaera* group played a critical role in nitrification of acidic upland soils. The increased soil pH and decreased soil C/N stimulated the growth of *Nitrosospira*.

Key words: acidic upland soils; fertilization; ammonia oxidizers; Illumina MiSeq sequencing; bioinformatics analysis

土壤氮素地球化学循环是农业生态系统研究的重要内容,硝化作用是土壤氮素转化的重要过程,是全球氮素循环中心,分为自养硝化和异养硝化^[1]. 自养硝化是指自养硝化微生物以无机碳为碳源将 NH_3 氧化为亚硝酸盐或者硝酸盐的过程,异养硝化是指异养硝化微生物以有机碳或有机氮化合物为碳源和能源进行硝化作用的过程. 我国典型生态系统中,农田硝化活性较高^[2],且以自养硝化作用为主^[3]. 自养硝化包括氨氧化和亚硝酸盐氧化过程,其中氨氧化过程是限速步骤,由氨氧化微生物执行,包括氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)和细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB). 氨氧化微生物的生长和活性受 pH^[4]、底物浓度^[5]、温度^[6]、土壤类型^[7]、氧气含量^[8]等多种环境因子影响. 施肥是农田生态系统重要管理措施,化肥和有机肥料输入可提升土壤营养元素含量、改变土壤 C/N,施有机肥可增加土壤 pH 值、提高土壤通透性等,而施化肥可引起土壤酸化、板结化等问题^[9]. 施肥后土壤性质改变会影响土壤微生物群落及生态功能^[10]. 目前,对于中性和偏酸性土壤中施肥对氨氧化微生物影响的研究较多,发现施加化肥和有机肥可提升土壤 AOA 和 AOB 丰度,其中主要 AOA 类群为 *Nitrosophara*, 主要 AOB 类群为 *Nitrosospira*^[11,12]; 且在中性和碱性土壤中 AOB 活性占据优势^[13,14].

酸碱度处于 4.5 ~ 5.5 之间的铁铝酸性红壤约占全国土地总面积 22.7%,具有氧化势高、酸性强、营养贫瘠等特点. 施肥对于提高酸性红壤农业产量及经济效益尤为重要. 由于红壤本底 pH 较低,施化肥对土壤造成的酸化作用不再明显,而施有机肥则显著提升土壤 pH、养分含量及通气性^[15]. 研究发现在强酸性土壤(pH < 5.5)中,对低底物浓度有更强亲和力的 AOA 活性更高^[16,17]. 但目前酸性土壤氨氧化微生物对于施肥的响应研究结论尚不一致^[15,18]. 因此,施化肥或有机肥对酸性土壤中氨氧化微生物的影响可能与中性或碱性土壤不同,其环境因子驱动机制也不清楚.

长期定位施肥试验是研究氨氧化微生物生态位分异特征的理想体系. 本研究选择长期定位施肥酸性旱地土壤,构建添加尿素(长期施肥试验用氮肥)

短期培养试验,采用微域培养联用定量 PCR (quantitative PCR, qPCR)、变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 及 Illumina MiSeq 高通量测序等分子生态学技术,分析培养过程中发挥硝化活性的、且占据活性优势的硝化微生物类群,研究自养硝化微生物群落及活性特征,并认知其与土壤理化因子间的关系,明确长期施用化肥或有机肥对酸性旱地土壤硝化活性及自养硝化微生物的影响及其机制,以期认识自养硝化微生物生理代谢多样性及生态功能提供了试验数据,也为酸性旱地土壤施肥管理提供参考.

1 材料与方 法

1.1 取样地点及土样处理

供试土壤采集于江西进贤红壤生态试验站(28°21'04"N, 116°10'16"E),该地区气候为典型亚热带季风气候,全年平均气温为 17.7°C,年降水量 1 727 mm. 试验地建于 1986 年,设有种植双季玉米的长期定位施肥试验田,种植期为每年 4 ~ 11 月. 本研究选用不施肥(CK)、施化肥(NPK)和施有机肥(OM)这 3 种土壤,各设置 3 个重复小区(5.5 m × 4 m). 肥料年施用量:氮肥(尿素),120 kg·hm⁻²; 磷肥(过磷酸钙),60 kg·hm⁻²; 钾肥(氯化钾),120 kg·hm⁻²; 有机肥(熟猪粪),2 000 kg·hm⁻². 有机肥和无机肥于每年玉米种植前作为基肥一次性施加. 于 2015 年 4 月(旱季玉米种植前)采样,各小区按 S 型五点采样法,采集耕作表层(0 ~ 15 cm)土壤,去除杂物与根系过 2 mm 筛后混匀. 部分土壤立即储存于 -80°C 用于分子生物学分析,部分土壤风干后用于理化性质分析,其余土壤于 4°C 保存. 本研究土壤基本理化性质测定方法参照文献[19],其中 pH 分别采用去离子水和 2 mol·L⁻¹ KCl 溶液以水土比 2.5:1 浸提.

1.2 土壤微域培养及样品采集

称取 10.00 g 鲜土于 120 mL 血清瓶中,橡胶塞封口,于 28°C 避光预培养 2 d. 预培养结束后加入终浓度(以干土计)为 100 mg·kg⁻¹ 的 Urea(尿素)溶液并添加去离子水调节土壤至 60% 最大持水量,用于筛选土壤中发挥硝化活性的功能微生物类群. 微域培养设置添加和未添加 C₂H₂(1%)处理,用于区分

自养和异养硝化过程^[20]. 每种处理设置 12 个血清瓶重复. 密封后于 28℃ 避光培养 7 d. 分别于 0、1、3、7 d 破坏性采样, 每次 3 个血清瓶重复.

1.3 土壤总 DNA 提取及 *amoA* 基因丰度测定

土壤微生物总 DNA 采用 FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (MP, Biomedicals, USA) 试剂盒提取. *amoA* 基因丰度采用 qPCR 法在 CFX96 Real-Time System (BIO-RAD, Laboratories Inc, USA) 上测定. AOA、AOB 的 *amoA* 基因扩增引物分别为 Arch-*amoA*F (5'-STA ATG GTC TGG CTT AGA CG-3')/Arch-*amoA*R (5'-GCC GCC ATC CAT CTG TAT GT-3')^[21] 和 *amoA*-1F (5'-GGG GTT TCT ACT GGT GGT-3')/*amoA*-2R (5'-CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC-3')^[22]. qPCR 反应体系、扩增程序、熔解曲线程序及 PCR 抑制检测方法见文献[15]. 采用 10 倍稀释含有标靶基因的重组质粒制作标准曲线, AOA、AOB 的 *amoA* 基因标准曲线模板浓度分别为 $2.44 \times 10^9 \sim 2.44 \times 10^3$ copies· μL^{-1} 和 $1.93 \times 10^9 \sim 1.93 \times 10^3$ copies· μL^{-1} , 扩增效率分别为 82.4% ($R^2 = 0.998$) 和 91.8% ($R^2 = 0.997$).

1.4 氨氧化微生物的 PCR-DGGE 分析

AOA *amoA* 基因扩增引物为 Arch-*amoA*F/Arch-*amoA*R. PCR 扩增采用 TaKaRa Ex *Taq* HS (Takara, Japan) 热启动酶, 反应体系同上. 扩增程序为: 预变性 95℃ 3 min, 变性 95℃ 30 s, 退火 55℃ 30 s, 延伸 72℃ 30 s, 设置 35 个循环, 终延伸 72℃ 6 min. 对 PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测及凝胶成像 (Chemidoc XRS+, BIO-RAD, USA). AOB 扩增产物浓度过低 ($< 0.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 不适用于后续 DGGE 分析.

每个样品取约 200 ng PCR 产物在 Dcode 系统 (Dcode Universal Mutation Detection System, BIO-RAD, USA) 中进行 DGGE 分析. 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 6%, 变性梯度为 30% ~ 65% (丙烯酰胺: 聚丙烯酰胺 = 37.5:1, 100% 变性剂由 40% 去离子甲酰胺和 7 mol·L⁻¹ 的尿素配制而成). 60℃, 80 V, 电泳 17 h. 采用 SYBR Green I (Invitrogen, USA) 染色 30 min 后成像. 切割下 DGGE 图谱中优势条带, 清洗后加入 40 μL 无菌水于 4℃ 静置过夜以洗脱 DNA. 采用 pEASY-T1 vector (TransGen Biotech, China) 进行克隆, 每个条带选取 3 个阳性克隆子送测 (Sangon Biotech, China). 将测序结果与 NCBI 数据库进行比对.

1.5 MiSeq 高通量测序分析

16S rRNA 基因扩增引物采用 V4-V5 高变区通

用引物 515F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3')/907R (5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3'). 反应体系为 50 μL , 包括 25 μL TaKaRa Ex *Taq* HS (Takara, Japan), 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物各 0.5 μL , 1 μL 模板 DNA 及 23 μL 无菌水. 反应程序: 预变性 94℃ 3 min, 变性 95℃ 30 s, 退火 55℃ 30 s, 延伸 72℃ 30 s, 设置 30 个循环, 终延伸 72℃ 6 min. 设置 3 个重复, 对 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测及割胶纯化 (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Takara, Japan). 委托中科院南京土壤研究所分析测试中心采用 Illumina MiSeq 平台进行高通量测序分析.

采用 FLASH (v1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) 对序列进行拼接; 通过 Qiime (V1.8.0, <http://qiime.org/>) 和 USEARCH (V5.2.236, <http://www.drive5.com/usearch/>) 过滤序列并去除嵌合体. 共获得 228 031 条序列, CK、NPK 和 OM 土壤获得的高质量序列数分别为 26 040 ~ 27 730、25 482 ~ 26 907 和 21 687 ~ 25 220 条. 为避免测序深度不同导致的误差, 每个样本随机抽取 19 600 条序列参与统计分析. 以 97% 的序列相似度水平划分 OTU, 剔除相对丰度低于 0.001% 的 OTU. 序列与 RDP 数据库 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 进行比对分类.

1.6 数据分析

本研究以添加自养硝化作用抑制剂 C₂H₂ 处理的硝化速率表征异养硝化速率, 以不添加 C₂H₂ 与添加 C₂H₂ 处理的硝化速率差值表征自养硝化速率. 采用 Excel 2013、SPSS 16.0 统计软件对试验数据进行分析; 采用单因素方差分析法区分样品间的显著性差异 ($n = 3$, Duncan's test, $P < 0.05$); 采用 MEGA 4.0 构建系统发育树, 建树方法为 Neighbor-Joining 法, Bootstrap 设为 1 000. 采用逐步回归分析方法分析土壤硝化活性、硝化微生物丰度及组成与土壤理化因子之间的关系, 其中 pH 值选用 KCl 溶液浸提测定数值.

2 结果与分析

2.1 长期施肥处理土壤基本理化性质

单因素方差分析表明 (表 1), 与 CK 土壤相比, NPK 土壤含水率、SOC、NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 均显著升高, OM 土壤 pH、含水率、SOC、TN、NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 均显著升高, C/N 显著降低. 其中, 用去离子水浸提测得 pH 值比用 2 mol·L⁻¹ KCl 溶液浸提测定

结果高 0.87 ~ 1.19 单位. 结果显示施用化肥和有机肥显著提高了土壤含水率、SOC 和土壤无机氮含

量; 施用有机肥显著提高了土壤 pH 和 TN 含量, 但显著降低了土壤 C/N.

表 1 供试土壤理化性质¹⁾

Table 1 Characteristics of the soil in this study

处理	pH (H ₂ O)	pH (KCl)	含水率 /%	SOC /g·kg ⁻¹	TN /g·kg ⁻¹	NH ₄ ⁺ -N /mg·kg ⁻¹	NO ₃ ⁻ -N /mg·kg ⁻¹	C/N
CK	5.03 ± 0.02b	3.88 ± 0.12b	17.9 ± 0.33c	7.74 ± 0.23c	0.82 ± 0.01b	4.52 ± 0.90b	6.15 ± 1.56b	19.2 ± 0.47a
NPK	4.66 ± 0.13c	3.79 ± 0.10b	20.1 ± 0.30b	8.70 ± 0.41b	0.94 ± 0.03b	27.8 ± 3.64a	25.5 ± 3.93a	18.8 ± 0.16a
OM	6.40 ± 0.05a	5.21 ± 0.44a	22.0 ± 0.28a	12.0 ± 0.49a	1.28 ± 0.01a	33.0 ± 32.2a	23.9 ± 0.86a	17.1 ± 0.32b

1) SOC: 土壤有机碳, TN: 土壤总氮, C/N: 土壤碳氮比; 同一列不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05, n = 3$)

2.2 微域培养过程中土壤无机氮含量变化

微域培养过程中, 各处理土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 含量动态变化曲线见图 1. 不添加 C₂H₂ 处理的 CK、NPK 和 OM 土壤 NO₃⁻-N 含量显著上升, 分别从第 0 d 的 4.82、24.04、29.14 mg·kg⁻¹ 上升至第 7 d 的 20.91、67.14、133.15 mg·kg⁻¹; 添加 C₂H₂ 后, CK 土

壤 NO₃⁻-N 含量无显著变化, NPK 和 OM 土壤 NO₃⁻-N 含量略微上升, 分别从第 0 d 的 24.15 mg·kg⁻¹ 和 29.12 mg·kg⁻¹ 上升至第 7 d 的 36.53 mg·kg⁻¹ 和 52.81 mg·kg⁻¹; 土壤 NH₄⁺-N 含量下降趋势与土壤 NO₃⁻-N 含量上升趋势吻合, 表明土壤 NO₃⁻-N 产生自 NH₄⁺-N 的氧化, 且 7 d 培养周期内底物充足.

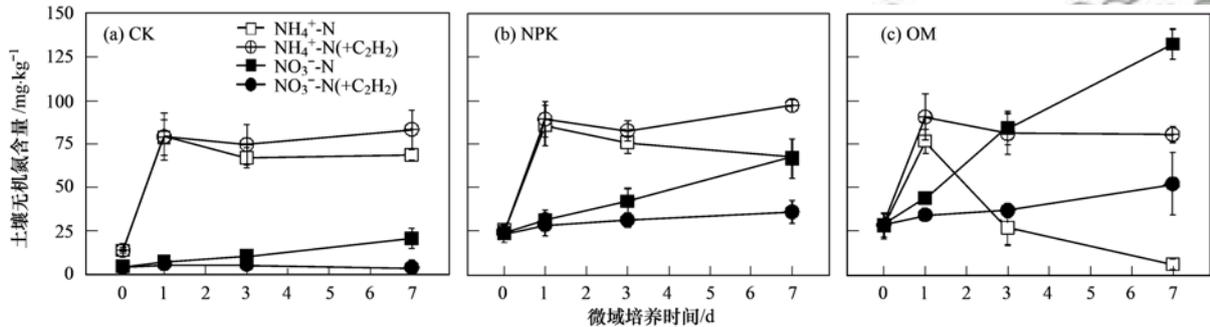


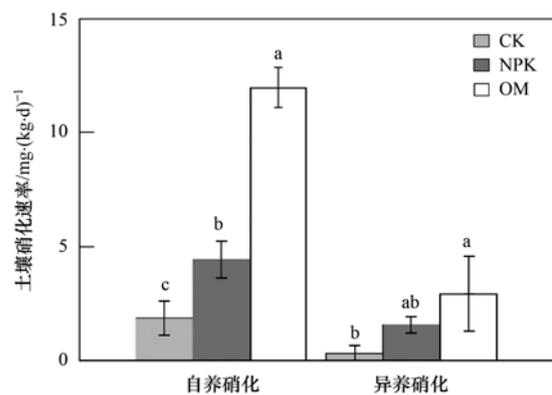
图 1 培养过程中土壤无机氮含量变化规律

Fig. 1 Changes in inorganic nitrogen contents during the incubation

CK、NPK 和 OM 土壤的自养硝化速率分别为 1.86、4.46 和 11.98 mg·(kg·d)⁻¹, 且 OM、NPK 土壤自养硝化速率分别是 CK 土壤的 6.44 倍和 2.40 倍; 异养硝化速率分别为 0.32、1.60 和 2.93 mg·(kg·d)⁻¹; 自养硝化占总硝化速率的比例分别为 85.32%、73.60% 和 80.35% (图 2). 表明本研究土壤中自养硝化作用占据主导, 施化肥和有机肥显著提高土壤自养硝化速率, 施有机肥提高土壤异养硝化速率.

2.3 微域培养过程中土壤 AOA 和 AOB 群落丰度变化

培养前后 CK、NPK 和 OM 土壤古菌和细菌的 amoA 基因拷贝数见图 3(a) 和 3(b). 无论是否添加 C₂H₂ 处理, CK 与 NPK 土壤培养结束时的 AOA 和 AOB 的 amoA 基因拷贝数与培养前无显著差异; OM 土壤不添加 C₂H₂ 处理 (Day-7) 的 AOA 和 AOB 的 amoA 基因拷贝数显著高于培养前 (Day-0). 即培养过程中 CK、NPK 的 AOA 和 AOB 的绝对丰度



图中不同字母表示簇内数据差异显著, $P < 0.05, n = 3$

图 2 土壤自养和异养硝化速率

Fig. 2 Soil autotrophic and heterotrophic nitrification rates

并无显著变化, 而 OM 中 AOA 和 AOB 绝对丰度显著增长. 培养后施有机肥土壤 AOA 和 AOB 的 amoA 基因绝对丰度 (以干土计, 下同) 分别为 2.04×10^9 copies·g⁻¹、 4.31×10^8 copies·g⁻¹, 远高于施化肥土壤的 5.96×10^8 copies·g⁻¹、 3.75×10^7 copies·g⁻¹ 和

不施肥土壤的 6.58×10^8 copies·g⁻¹、 1.13×10^7 copies·g⁻¹。

培养前后 CK、NPK 和 OM 土壤 AOA-like 16S rRNA 和 AOB-like 16S rRNA 基因相对丰度 (Illumina MiSeq 分析) 见图 3(c) 和 3(d)。微域培养后 (Day-7), 不添加 C₂H₂ 处理的 CK、NPK 和 OM 土壤中 AOA-like 16S rRNA 的相对丰度分别为 1.42%、1.95% 和 1.87%, 显著高于培养前和添加 C₂H₂ 处

理。不添加 C₂H₂ 处理, 培养后 CK 和 NPK 土壤中 AOB-like 16S rRNA 的相对丰度分别为 1.22% 和 1.12%, 与培养前和添加 C₂H₂ 处理无显著差异; 而培养后 OM 土壤 AOB-like 16S rRNA 的相对丰度比例为 2.20%, 显著高于培养前和添加 C₂H₂ 处理。

微域培养前后 AOA 和 AOB 的绝对丰度和相对丰度变化规律表明: 3 种土壤中 AOA 均有明显活性, 而仅在 OM 土壤中检测到 AOB 活性。

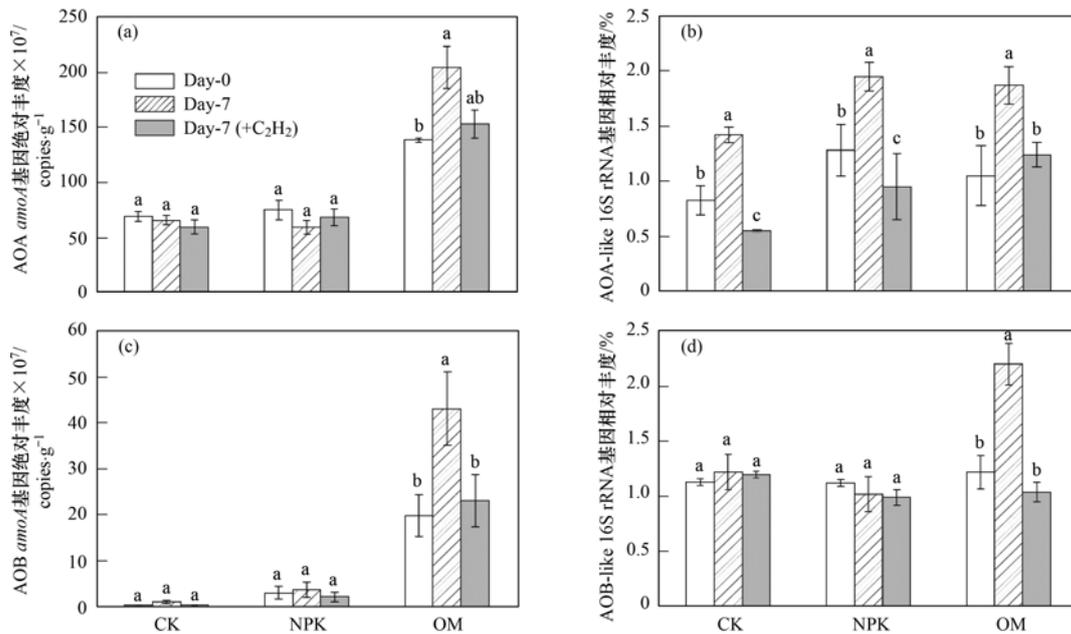


图3 培养前后土壤 AOA 和 AOB *amoA* 基因绝对丰度及 16S rRNA 基因相对丰度变化规律

Fig. 3 Abundance of archaeal and bacterial *amoA* genes and relative abundance of AOA-like 16S rRNA and AOB-like 16S rRNA genes before and after the incubation

2.4 微域培养过程中土壤硝化微生物群落组成变化

培养前后 CK、NPK 和 OM 土壤的 AOA 群落结构 DGGE 图谱见图 4。CK 和 NPK 土壤 DGGE 图谱较相似, 与 OM 土壤有明显差异。7 d 培养结束后, CK 土壤不添加 C₂H₂ 处理的 A1、A3 条带亮度加深, A6 条带亮度变浅, C₂H₂ 处理的 A1、A2、A3 条带亮度变浅, A6 条带亮度变深; NPK 处理不添加 C₂H₂ 处理的 A1、A3 条带亮度加深, A6 条带亮度变浅, C₂H₂ 处理的 A1、A3 条带亮度变浅, A6 条带亮度变深; OM 土壤不添加 C₂H₂ 处理的 A4 条带亮度变深, A9 条带亮度变浅, C₂H₂ 处理的 A4 条带亮度变浅。结果显示培养过程不同 AOA 类群生长状况不同。对各处理土壤 DGGE 图谱中的优势条带进行测序并进行古菌 *amoA* 基因序列系统发育分析 (图 5)。CK、NPK 和 OM 土壤的 DGGE 条带 A1 ~ A9 与已知氨氧化古菌 *Nitrososphaera* sp. EN76 和 JG1 聚成一簇, 均隶属于 *Nitrososphaera* (group 1.1b)。培养

前后各处理土壤硝化微生物在属水平上的丰度变化见图 6。CK、NPK 和 OM 土壤 AOA 中的 *Nitrososphaera* 相对丰度较培养前均有明显上升, 分别从 0.79%、1.28% 和 1.05% 上升至 1.41%、1.94% 和 1.87%, 分别占总 AOA 类群的 99.30%、99.49% 和 99.99%。 *Nitrosotalea* (Group 1.1a-associated) 培养前后相对丰度无显著变化。

3 种土壤中 *Nitrosospira* 占总 AOB 类群比例均大于 99.99%, 表明 *Nitrosospira* 是本研究土壤中最主要的 AOB 类群 (图 6)。CK、NPK 土壤 AOB 中的 *Nitrosomonas* 和 *Nitrosospira* 相对丰度培养前后无显著变化, 而 OM 土壤的 *Nitrosomonas* 相对丰度无显著变化, *Nitrosospira* 相对丰度则从 1.22% 显著上升至 2.18%。

3 种土壤的 *Nitrosospira* 占总 NOB 类群的比例分别为 94.59%、96.25% 和 96.69%, 表明 *Nitrosospira* 是本研究土壤中最主要的 NOB 类群 (图 6)。NOB

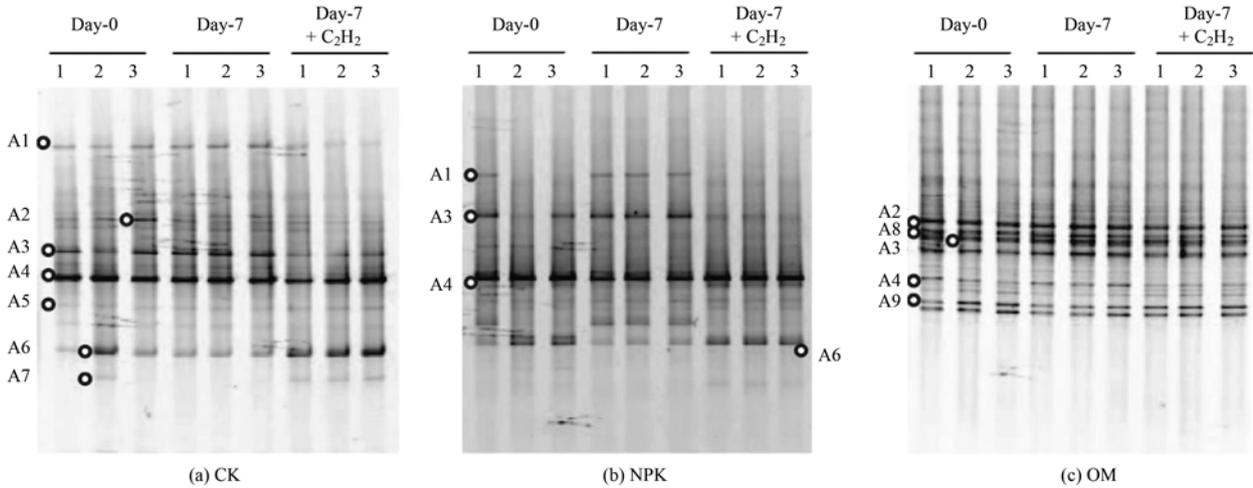


图 4 培养前后土壤 AOA *amoA* 基因 DGGE 分析

Fig. 4 DGGE analysis based on the archaeal *amoA* gene before and after the incubation

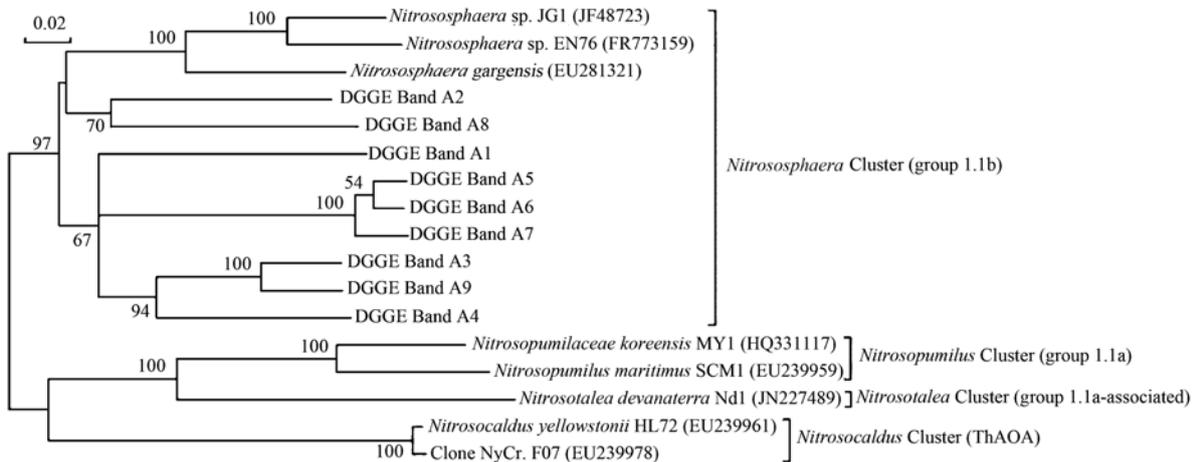


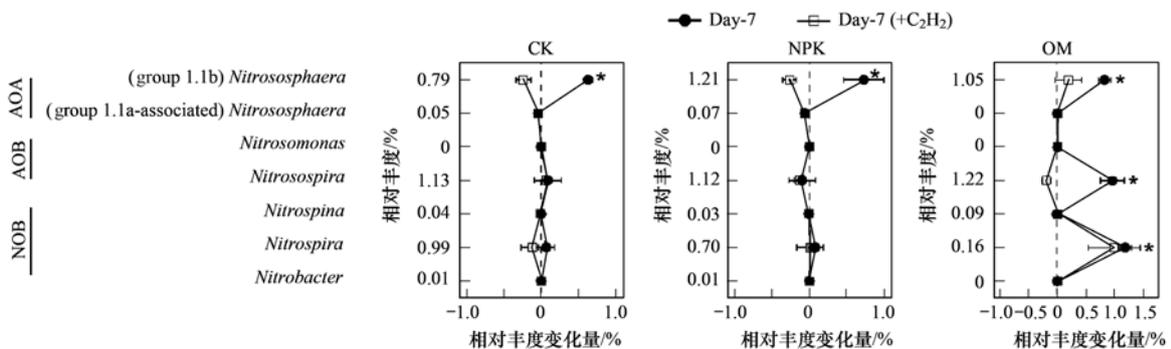
图 5 DGGE 条带中 *amoA* 基因序列系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on the archaeal *amoA* gene in DGGE bands

群落分析显示,CK、NPK 土壤 NOB 中的 *Nitrospina*、*Nitrospira* 和 *Nitrobacter* 相对丰度培养前后无显著性差异; OM 土壤的 *Nitrospina* 和 *Nitrobacter* 相对丰度

无显著变化,而 *Nitrospira* 则从 1.16% 显著上升至 2.34%.

微域培养前后 AOA 和 AOB 群落组成分析表



纵坐标数据为 Day-0 各微生物类群相对丰度; * 表示 $P < 0.05$, 独立样本 T 检验, $n = 3$

图 6 培养前后土壤 AOA、AOB 和 NOB 相对丰度变化量

Fig. 6 Changes in relative abundance of different AOA, AOB and NOB populations in total pyrosequencing reads before and after the incubation

明;CK 和 NPK 土壤硝化微生物丰度变化较相似,显示 *Nitrososphaera* 属 AOA 具有活性;而 OM 土壤中, *Nitrososphaera* 属 AOA、*Nitrospira* 属 AOB 和 *Nitrospira* 属 NOB 均具有活性。

2.5 长期施肥土壤硝化活性及硝化微生物群落变化的环境因子分析

逐步回归分析显示(表 2),土壤总硝化速率显

著受 TN 含量影响,自养硝化速率也与土壤 TN 含量显著相关,异养硝化速率与 NH_4^+ -N 和 SOC 含量显著相关;土壤 AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度分别与土壤 SOC 含量和 pH 显著相关;土壤 *Nitrososphaera* 属 AOA 相对丰度与土壤 NO_3^- -N 含量显著相关;土壤 *Nitrospira* 属 AOB 和 *Nitrospira* 属 NOB 相对丰度与 C/N 显著负相关。

表 2 土壤硝化活性、硝化微生物丰度与土壤理化性质的逐步回归分析

Table 2 Stepwise regression analysis between nitrification activities, abundance of nitrification oxidizers and soil characteristics

因变量	预测变量 (标准化系数)	R^2
硝化速率	TN (0.945 **)	0.995
自养硝化速率	TN (0.992 **)	0.994
异养硝化速率	NH_4^+ -N (0.657 **), SOC(0.437 *)	0.956
AOA <i>amoA</i> 基因绝对丰度	SOC (0.974 **)	0.948
AOB <i>amoA</i> 基因绝对丰度	pH (0.968 **)	0.937
<i>Nitrososphaera</i> 16S rRNA 基因相对丰度	NO_3^- -N (0.899 **)	0.809
<i>Nitrospira</i> 16S rRNA 基因相对丰度	C/N (-0.902 **)	0.814
<i>Nitrospira</i> 16S rRNA 基因相对丰度	C/N (-0.883 **)	0.779

1) * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$

3 讨论

3.1 长期施肥对酸性旱地土壤硝化活性的影响

土壤硝化作用分为自养硝化和异养硝化,农业生产活动,如施肥、灌溉等会改变土壤特性,从而影响硝化活性。本研究发现施化肥显著提升了土壤的自养硝化速率,而施有机肥土壤的自养和异养硝化速率均有显著提升,且施有机肥土壤自养硝化速率增加了 6.44 倍。Muller 等^[23]对北爱尔兰长期定位施肥 38a 的土壤研究显示,施无机肥和有机肥均会显著提升土壤自养和异养硝化速率,且硝化速率(尤其是自养硝化)受有机肥的刺激更为明显,与本研究结果一致。Wang 等^[24]对我国南部紫色土的研究表明,相较于不施肥土壤的硝化速率 [$8.90 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$],施无机肥和有机肥土壤的硝化速率分别显著上升至 $23.53 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 和 $27.81 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 。可见,施肥给土壤自养硝化作用提供大量底物,其中施有机肥还会为土壤提供有效碳和其他对改善土壤肥力有益的养分,提高土壤 pH 进而促进自养硝化^[25]。

逐步回归分析表明,本研究土壤总硝化速率的主要影响因子为 TN、 NH_4^+ -N; 其中影响自养硝化速率的理化因子为 TN,而异养硝化速率与 NH_4^+ -N 和 SOC 含量显著相关。Xue 等^[26]对酸性茶园土壤 (pH 3.71 ~ 4.22) 和 Zhong 等^[27]对酸性水稻土壤 (pH 5.03 ~ 5.77) 的研究也证实了施肥带来的底物含量

积累可能是酸性农业土壤硝化作用提升的重要原因。另外,前人研究发现土壤硝化速率与土壤 pH 显著正相关^[28],调节酸性土壤 pH 后,土壤硝化速率会随土壤 pH 的显著上升而增加^[29]。而本研究选用的酸性旱地土壤本底 pH 极低 (pH = 3.88),施化肥导致大量硝化底物流入土壤环境,但没有加剧土壤酸化,因此是 TN、 NH_4^+ -N 等硝化底物含量而不是 pH,是影响长期定位施肥酸性土壤硝化速率的主控因子。异养硝化是以含氮有机物或有机碳和铵作为碳源和能源氧化氮的过程,本研究中土壤异养硝化速率的主控因子为 NH_4^+ -N 和 SOC, Wrage 等^[30]发现高有机碳、低 pH 的土壤环境均会促进异养硝化,与本研究结果一致。

3.2 长期施肥对酸性旱地土壤自养硝化微生物的影响

本研究发现施肥和不施肥土壤中 AOA 均有自养硝化活性,而 AOB 仅在 OM 土壤中具有活性,即施化肥没有影响土壤氨氧化微生物的组成,而施有机肥改变了土壤活性氨氧化微生物类群。前人运用稳定同位素核酸探针技术发现在中性或者偏碱性 (pH 6.90 ~ 8.00) 土壤中 AOB 具有较高氨氧化活性^[31,32];但在酸性土壤 (pH 4.20 ~ 4.47) 中仅检测到 AOA 具有自养氨氧化活性^[15,33]。可见,相比于 AOB, AOA 在酸性土壤中能够发挥主导优势的功能活性。分析原因:酸性土壤中氨氧化作用底物浓度较低(氨分子浓度受 pH 影响, $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+$,

$pK_a = 9.25$, 即 pH 越低 NH_3 含量越低), 有利于对氨分子有较高亲和力的 AOA 的生长^[16]. 有研究表明在 NH_3 含量较低 ($7.0 \sim 87.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的土壤中, AOA 是主要的氨氧化执行者; 而在 NH_3 含量较高 ($6.73 \sim 232 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的土壤中, AOB 是主要执行者. 其次, AOA 具有独特的代谢途径和生理代谢特点以长期适应低 pH、低营养等逆境^[20,31-33]. 本研究发现 AOB 的丰度与 pH 显著正相关、与 C/N 显著负相关. 因为长期有机肥施加显著提升土壤 pH 至近中性, 极大的提升了土壤 NH_3 含量和 TN 比例, 使得 AOB 在 OM 中有明显自养硝化活性; 而 CK 和 NPK 土壤呈强酸性, 极大地抑制了 AOB 活性, 导致在本研究没有检测到 AOB 活性.

本研究还发现土壤中活跃的 AOA 类群是 *Nitrososphaera*. Zhang 等^[34] 的研究表明, 长期施无机肥和无机肥-有机肥配施土壤 (pH 6.3) 中 AOA 优势类群为 *Nitrososphaera*, 与本研究结果一致; 而 Wang 等^[15] 对长期施肥红壤 (pH 3.11 ~ 5.55) 的研究认为优势 AOA 类群却为 *Nitrosotalea* (group 1.1a-associated), 与本研究结果不同. 本研究显示酸性土壤中发挥重要作用的 AOA 类群通常是 *Nitrosotalea*, 且全球尺度^[35] 和全国尺度^[36] 上宏基因组研究也发现 *Nitrososphaera* 类群相对丰度与土壤 pH 显著正相关, 而 *Nitrosotalea* 类群相对丰度与土壤 pH 呈显著负相关; 且纯菌株 *Nitrosotalea devanattera*^[37] 为嗜酸性菌、*Nitrososphaera viennensis* EN76 和 JG1 为嗜中性菌^[38,39]. 但近年来科学家也在酸性农田土壤 (pH 4.92) 中发现 *Nitrososphaera* 具有功能优势, 且与已报道的嗜中性的 *Nitrososphaera viennensis* EN76 高度相似^[17], 而笔者在其他酸性土壤中也发现了相似结果 (未发表数据). 本研究中 AOA 的丰度与 SOC 和 NO_3^- -N 含量显著正相关, 相关研究^[13,40] 也发现相似结果. 硝酸盐是硝化作用产物, AOA 丰度与硝酸盐含量相关, 也证明 AOA 在本研究酸性土壤硝化过程中发挥了巨大作用. 而许多研究还表明 AOA 具有利用有机底物的潜力或能够受有机底物刺激生长^[38,41], 暗示 SOC 也会影响 AOA 在土壤中的角色. 可见, group 1.1b 在酸性和中性土壤中都能发挥主导作用, 打破了研究者对于 AOA 群落分布及生态功能的一贯认识, 具体原因还需进一步研究.

另外, 本研究中活跃的 AOB 类群为 *Nitrosospira*. *Nitrosospira* 是土壤中最为活跃的 AOB 类群, 在很多土壤中均占有优势^[5]. 本研究还在 OM 土壤中发现 NOB 活性明显, 优势类群为 *Nitrosospira*,

且与 C/N 显著负相关. 前人对种植冬小麦的长期施肥土壤的研究表明^[42], 长期施肥显著增加了土壤 *Nitrosospira* 的相对丰度, 与本研究结果一致. 施有机肥导致大量的硝化底物与养分流入土壤, 进而刺激土壤 NOB 的增长, TN 的增加导致 C/N 显著降低, 与 NOB 的增长呈现负相关.

4 结论

本研究显示长期施化肥与有机肥均会改变土壤各项理化因子, 土壤 TN 含量显著刺激酸性旱地土壤自养硝化活性上升, 其中施有机肥刺激更加明显. 长期施肥酸性旱地土壤中 AOA 均有明显活性, 其优势类群为 *Nitrososphaera*, 其丰度与 SOC 和 NO_3^- -N 含量显著正相关. 仅在施有机肥土壤中检测到 AOB (优势类群为 *Nitrosospira*) 和 NOB (优势类群为 *Nitrosospira*) 活性, 其中 AOB 丰度与 pH 显著正相关、与 C/N 显著负相关, NOB 丰度与 C/N 显著负相关.

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
Guo Z Y, Jia Z J. Meta-analysis of soil nitrification activity in ecosystems typical of China [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2014, **51**(6): 1317-1324.
- [3] 王敬, 程谊, 蔡祖聪, 等. 长期施肥对农田土壤氮素关键转化过程的影响 [J]. *土壤学报*, 2016, **53**(2): 292-304.
Wang J, Cheng Y, Cai Z C, et al. Effects of long-term fertilization on key processes of soil nitrogen cycling in agricultural soil: a review [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2016, **53**(2): 292-304.
- [4] Nicol G W, Leininger S, Schleper C, et al. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, **10**(11): 2966-2978.
- [5] 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 and Biochemistry*, 2016, **93**: 150-159.
- [6] Wu Y C, Ke X B, Hernández M, et al. Autotrophic growth of bacterial and archaeal ammonia oxidizers in freshwater sediment microcosms incubated at different temperatures [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, **79**(9): 3076-3084.
- [7] Chen X P, Zhu Y G, Xia Y, et al. Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil? [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, **10**(8): 1978-1987.
- [8] Wang B Z, Zhao J, Guo Z Y, et al. Differential contributions of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers to nitrification in four paddy soils [J]. *The ISME Journal*, 2015, **9**(5): 1062-1075.

- [9] 孟红旗, 刘景, 徐明岗, 等. 长期施肥下我国典型农田耕层土壤的 pH 演变[J]. 土壤学报, 2013, **50**(6): 1109-1116.
Meng H Q, Liu J, Xu M G, *et al.* Evolution of pH in topsoils of typical Chinese croplands under long-term fertilization[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2013, **50**(6): 1109-1116.
- [10] 张逸飞, 刘娟娟, 孟磊, 等. 农业利用对海南省天然次生林土壤微生物的影响[J]. 生态学报, 2015, **35**(21): 6983-6992.
Zhang Y F, Liu J J, Meng L, *et al.* Agricultural use of natural secondary forests affects soil microorganisms in Hainan Province, China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, **35**(21): 6983-6992.
- [11] Xue C, Zhang X, Zhu C, *et al.* Quantitative and compositional responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria to long-term field fertilization[J]. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 28981.
- [12] Zhou X, Fornara D, Wasson E A, *et al.* Effects of 44 years of chronic nitrogen fertilization on the soil nitrifying community of permanent grassland[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, **91**: 76-83.
- [13] 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.
- [14] Wu Y C, Lu L, Wang B Z, *et al.* Long-Term field fertilization significantly alters community structure of ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea in a paddy soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2011, **75**(4): 1431-1439.
- [15] Wang X L, Han C, Zhang J B, *et al.* Long-term fertilization effects on active ammonia oxidizers in an acidic upland soil in China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, **84**: 28-37.
- [16] Martens-Habbena W, Berube P M, Urakawa H, *et al.* Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria[J]. *Nature*, 2009, **461**(7266): 976-979.
- [17] Wang B Z, Zheng Y, Huang R, *et al.* Active ammonia oxidizers in an acidic soil are phylogenetically closely related to neutrophilic archaeon [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, **80**(5): 1684-1691.
- [18] He J Z, Shen J P, Zhang L M, *et al.* Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, **9**(9): 2364-2374.
- [19] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [20] Lu L, Han W Y, Zhang J B, *et al.* Nitrification of archaeal ammonia oxidizers in acid soils is supported by hydrolysis of urea [J]. *The ISME Journal*, 2012, **6**(10): 1978-1984.
- [21] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, *et al.* Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**(41): 14683-14688.
- [22] 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.
- [23] Müller C, Laughlin R J, Christie P, *et al.* Effects of repeated fertilizer and cattle slurry applications over 38 years on N dynamics in a temperate grassland soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, **43**(6): 1362-1371.
- [24] Wang J, Zhu B, Zhang J B, *et al.* Mechanisms of soil N dynamics following long-term application of organic fertilizers to subtropical rain-fed purple soil in China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, **91**: 222-231.
- [25] Cheng Y, Wang J, Mary B, *et al.* Soil pH has contrasting effects on gross and net nitrogen mineralizations in adjacent forest and grassland soils in central Alberta, Canada[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, **57**: 848-857.
- [26] Xue D, Yao H Y, Huang C Y. Microbial biomass, N mineralization and nitrification, enzyme activities, and microbial community diversity in tea orchard soils [J]. *Plant and Soil*, 2006, **288**(1-2): 319-331.
- [27] Zhong W H, Cai Z C, Zhang H. Effects of long-term application of inorganic fertilizers on biochemical properties of a rice-planting red soil[J]. *Pedosphere*, 2007, **17**(4): 419-428.
- [28] 鲍俊丹, 石美, 张妹婷, 等. 中国典型土壤硝化作用与土壤性质的关系[J]. 中国农业科学, 2011, **44**(7): 1390-1398.
Bao J D, Shi M, Zhang M T, *et al.* Nitrification of main soils in China and its relationship with soil properties [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, **44**(7): 1390-1398.
- [29] 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 M M, Wang B R, Li D C, *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.
- [30] Wrage N, Velthof G L, van Beusichem M L, *et al.* Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, **33**(12-13): 1723-1732.
- [31] Jia Z J, Conrad R. *Bacteria* rather than *Archaea* dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil [J]. *Environmental Microbiology*, 2009, **11**(7): 1658-1671.
- [32] Xia W W, Zhang C X, Zeng X W, *et al.* Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil [J]. *The ISME Journal*, 2011, **5**(7): 1226-1236.
- [33] Zhang L M, Hu H W, Shen J P, *et al.* Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils [J]. *The ISME Journal*, 2012, **6**(5): 1032-1045.
- [34] Zhang Q, Liang G Q, Myrold D D, *et al.* Variable responses of ammonia oxidizers across soil particle-size fractions affect nitrification in a long-term fertilizer experiment[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, **105**: 25-36.
- [35] Gubry-Rangin C, Hai B, Quince C, *et al.* Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**(52): 21206-21211.
- [36] Hu H W, Zhang L M, Dai Y, *et al.* pH-dependent distribution of soil ammonia oxidizers across a large geographical scale as revealed by high-throughput pyrosequencing[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2013, **13**(8): 1439-1449.
- [37] Lehtovirta-Morley L E, Stoecker K, Vilcinskas A, *et al.* Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a

- nitrifying acid soil[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, **108** (38): 15892-15897.
- [38] Tourna M, Stieglmeier M, Spang A, *et al.* *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, **108**(20): 8420-8425.
- [39] Kim J G, Jung M Y, Park S J, *et al.* Cultivation of a highly enriched ammonia-oxidizing archaeon of thaumarchaeotal group I. 1b from an agricultural soil [J]. Environmental Microbiology, 2012, **14**(6): 1528-1543.
- [40] 吕玉, 周龙, 龙光强, 等. 不同氮水平下间作对玉米土壤硝化势和氨氧化微生物数量的影响[J]. 环境科学, 2016, **37** (8): 3229-3236.
- Lü Y, Zhou L, Long G Q, *et al.* Effect of different nitrogen rates on the nitrification potential and abundance of ammonia-oxidizer in intercropping maize soils [J]. Environmental Science, 2016, **37**(8): 3229-3236.
- [41] Levičnik-Höfferle Š, Nicol G W, Ausec L, *et al.* Stimulation of thaumarchaeal ammonia oxidation by ammonia derived from organic nitrogen but not added inorganic nitrogen [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, **80**(1): 114-123.
- [42] 李晨华, 张彩霞, 唐立松, 等. 长期施肥土壤微生物群落的剖面变化及其与土壤性质的关系[J]. 微生物学报, 2014, **54**(3): 319-329.
- Li C H, Zhang C X, Tang L S, *et al.* Effect of long-term fertilizing regime on soil microbial diversity and soil property [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, **54**(3): 319-329.

环 境 科 学

CONTENTS

Evaluation and Development of a Weighing Chamber by Using Saturated $MgCl_2$ Solution	LI Xiao-xiao, ZHANG Qiang, DENG Jian-guo, <i>et al.</i>	(3095)
Characteristics Research on Carbonaceous Component of Particulate Matter Emitted from Iron and Steel Industry	ZHANG Jin-sheng, WU Jian-hui, MA Xian, <i>et al.</i>	(3102)
Pollution Characteristics and Source Identification of PAHs in Atmospheric $PM_{2.5}$ in Changzhou City	GU Ai-jun, LIU Jia-shu, LUO Shi-peng, <i>et al.</i>	(3110)
Atmospheric Dry Deposition Fluxes and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Lanzhou Valley, Northwest China	JU Yuan-li, LIU Pan-liang, YU Zhou-suo, <i>et al.</i>	(3120)
Characteristics and Sources of Elements in Atmospheric Dust Fall in Zhuzhou City, Central China	WANG Shi-bao, ZHANG Kai, CHAI Fa-he, <i>et al.</i>	(3130)
Atmospheric Pollutant Emission Characteristics from the Cooking Process of Traditional Beijing Roast Duck	XU Min, HE Wan-qing, NIE Lei, <i>et al.</i>	(3139)
Exhaust Emission Characteristics of Typical Alkanes from Heavy-Duty Diesel Vehicles Based on a Portable Emission Measurement System	SHI Chun-zhen, HAO Xue-wei, SHEN Xian-bao, <i>et al.</i>	(3146)
PM_{10} Concentration Forecasting Model Based on Wavelet-SVM	WANG Ping, ZHANG Hong, QIN Zuo-dong, <i>et al.</i>	(3153)
Emission Factors and Preliminary Emission Estimates of Air Pollutants from Ships at Berth in the Guangzhou Port	HUANG Xue-liang, ZHANG Zhou, YANG Wei-qiang, <i>et al.</i>	(3162)
Influence of Dust Events on the Concentration and Size Distribution of Microorganisms in Bioaerosols	LI Hong-tao, Qi Jian-hua, DONG Li-jie, <i>et al.</i>	(3169)
Odor Emission Characteristics and Pollution Evaluation from Typical Household Rubbish Disposal Facilities	LU Hui-jie	(3178)
Perfluorinated Compounds in Snow from Downtown Hangzhou, China	ZHANG Ming, TANG Fang-liang, YU Ya-yun, <i>et al.</i>	(3185)
Fluorescence Characterization of Fractionated Colloids in Wastewaters Received by Huangpu River	NIE Ming-hua, YAN Cai-xia, YANG Yi, <i>et al.</i>	(3192)
Sources of Organic Carbon in the Surface Water of Lijiang River	ZHAO Hai-juan, XIAO Qiong, WU Xia, <i>et al.</i>	(3200)
Impacts of Thermal Stratification on the Hydrochemistry and Dissolved Inorganic Carbon in a Typical Karst Reservoir in Summer	WU Fei-hong, PU Jun-bing, LI Jian-hong, <i>et al.</i>	(3209)
Comparison of Heavy Metal Contamination Characteristics in Surface Water in Different Functional Areas; A Case Study of Ningbo	XU Mei-juan, TONG Gui-hua, SUN Dan, <i>et al.</i>	(3218)
Comparison of Identification Methods of Main Component Hydrochemical Anomalies in Groundwater; A Case Study of Liujiang Basin	ZHANG Xiao-wen, HE Jiang-tao, PENG Cong, <i>et al.</i>	(3225)
Biotic and Abiotic Uptake of Phosphorus in Benthic Sediments of Suburban Streams Under Intense Human Disturbance Scenario	LI Ru-zhong, YE Zhou, GAO Su-di, <i>et al.</i>	(3235)
Sedimentary Phosphorus Speciation in the Coastal Hypoxic Area of Changjiang Estuary and Its Environmental Significance	LIU Jun, ZANG Jia-ye, RAN Xiang-bin, <i>et al.</i>	(3243)
Characteristics and the Relationship of Nitrogen and Phosphorus in Soil and Water of Different Land Use Types of a Small Watershed in the Three Gorges Reservoir Area	CHEN Cheng-long, GAO Ming, MU Zhi-jian, <i>et al.</i>	(3254)
Characteristics of Carbon Transportation Under Rainfall Events and Associated Carbon Loss Evaluation in Loess Plateau, China; A Case Study of Yangjuangou Dam Watershed	E Xin-hui, WANG Ya-feng, GAO Yang, <i>et al.</i>	(3264)
New Bromated Phenolic Disinfection Byproducts: Mechanism of Their Decomposition During Chlorination	LI Huan, LI Zheng-kui, LI Ai-min, <i>et al.</i>	(3273)
Effects of Algal Morphology and Al Species Distribution on the Coagulation-Ultrafiltration Process	ZHANG Da-wei, XU Hui, WANG Xi, <i>et al.</i>	(3281)
Functional Group Characteristics of Planktonic Diatoms and Their Relationship with Environmental Factors in the Ruxi River	XIANG Rong, LI Qiao-yu, YU Yi, <i>et al.</i>	(3290)
Spatiotemporal Variations of Chlorophyll a and Its Relationship to Environmental Factors in Shiyan Reservoir	SONG Yun-long, ZHANG Jin-song, Guo Xiao-ya, <i>et al.</i>	(3302)
Rhizosphere Microbial Diversity in Different Wetland Microcosms	WANG Lin, LI Bing, YU Jia-hui, <i>et al.</i>	(3312)
Community Structure of Microorganisms and Its Seasonal Variation in Beihai Lake	ZHANG Ya-jie, LI Ke, ZHU Hao-ran, <i>et al.</i>	(3319)
Analysis of Microbial Diversity in a Fluidized-Sand Biofilter Based on High-Throughput Sequencing Technology	ZHANG Hai-geng, SONG Hong-qiao, GU Chuan-chuan, <i>et al.</i>	(3330)
Analysis of High-efficiency Denitrifying Bacteria and Embedding Filler Performance and Microflora	MENG Ting, YANG Hong	(3339)
Selection of Microalgae for Biofuel Using Municipal Wastewater as a Resource	HAN Song-fang, JIN Wen-biao, TU Ren-jie, <i>et al.</i>	(3347)
Purification Effect of Piggery Wastewater with <i>Chlorella pyrenoidosa</i> by Immobilized Biofilm-Attached Culture	WANG Yuan-zhu, CHENG Peng-fei, LIU De-fu, <i>et al.</i>	(3354)
Combination of Microbubble Catalytic Ozonation and Biological Process for Advanced Treatment of Biotreated Coal Chemical Wastewater	LIU Chun, ZHOU Hong-zheng, ZHANG Jing, <i>et al.</i>	(3362)
Effect of pH Shock on Nitrogen Removal Performance of Marine Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria Treating Saline Wastewater	YU De-shuang, ZHOU Tong, LI Jin, <i>et al.</i>	(3369)
Removal of Nitrogen from Alcohol Wastewater by PN-ANAMMOX	ZHOU Zheng, LIN Xing, WANG Fan, <i>et al.</i>	(3377)
Biorecovery of Palladium from Simulated Wastewaters and Its Catalytic Property for Methylene Blue	KANG Nai-xin, ZHU Neng-wu, GUO Wen-ying, <i>et al.</i>	(3385)
Investigation of Initiation and Shock Process of ANAMMOX Based on Color Space	WANG Li-jun, LI Zhi-hua, HAN Dong, <i>et al.</i>	(3393)
Fast Start-up of Shortcut Nitrification in a CSTR and an MBR	ZHANG Ting, WU Peng, SHEN Yao-liang, <i>et al.</i>	(3399)
Conversion Pathways of Substrates in Sulfate-Reducing Ammonia Oxidation System	WANYAN De-qing, HUANG Yong, LI Zhen, <i>et al.</i>	(3406)
Effect of Different TOC to NH_4^+ -N Ratios on Nitrogen Removal Efficiency in the ANAMMOX Process	WANG Fan, LIU Kai, LIN Xing, <i>et al.</i>	(3415)
Effects of Salinity on the Operation of EGSB Reactors and the Anaerobic Granular Sludge	TAN Xiao, HUANG Liang, YANG Ping, <i>et al.</i>	(3422)
Start-up of Granule CANON Process and the Strategy for Enhancing Total Nitrogen Removal Rate	SUN Yan-fang, HAN Xiao-yu, ZHANG Shun-jun, <i>et al.</i>	(3429)
Effect of Extracellular Polymeric Substance (EPS) on the Adsorption of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) onto Activated Sludge	LIU Xin-tong, YIN Hua, PENG Hui, <i>et al.</i>	(3435)
Characteristics of N_2O and NO_x Emissions from Purple Soil Under Different Fertilization Regimes	HU Lei, LIU Yun, ZHU Bo	(3442)
Effect of Plastic Film Mulching on Methane Emission from a Vegetable Field	ZHANG Kai-li, HAO Qing-ju, FENG Di, <i>et al.</i>	(3451)
Responses of Soil Ammonia Oxidizers to Simulated Warming and Increased Precipitation in a Temperate Steppe of Inner Mongolia	ZHANG Cui-jing, SHEN Ju-pei, SUN Yi-fei, <i>et al.</i>	(3463)
Nitrification Activity and Autotrophic Nitrifiers in Long-term Fertilized Acidic Upland Soils	XU Bai-lu, ZHONG Wen-hui, HUANG Qian-ru, <i>et al.</i>	(3473)
Effects of $CaCO_3$ Application on Soil Microbial Nitrogen Cycle in an Acid Soil	GUO An-ning, DUAN Gui-lan, ZHAO Zhong-qiu, <i>et al.</i>	(3483)
Responses of Extracellular Enzymes to Nitrogen Application in Rice of Various Ages with Rhizosphere and Bulk Soil	WEI Liang, TANG Zhen-zhu, ZHU Zhen-ke, <i>et al.</i>	(3489)
Variation in the Temperature Sensitivity of Surface Litter Respiration and Its Influencing Factors	ZHANG Yan-jun	(3497)
Magnetic Properties of Farmland Soils in Arid Regions in Northwest China and Their Environmental Implications	WANG Xin, XIA Dun-sheng, WANG Bo, <i>et al.</i>	(3507)
Preparation of Magnetic Biomass Carbon by Thermal Decomposition of Siderite Driven by Wheat Straw and Its Adsorption on Cadmium	ZHANG Ru-yu, LIU Hai-bo, ZOU Xue-hua, <i>et al.</i>	(3519)
Effects of Traffic-related Air Pollution Exposure on DNA Methylation	WANG Ting, DING Rui, HUANG Dan-ni, <i>et al.</i>	(3529)
Effects of Exogenous Microorganism Inoculation on Efficiency and Bacterial Community Structure of Sludge Composting	YANG Ping-ping, YIN Hua, PENG Hui, <i>et al.</i>	(3536)
Life Cycle Assessment of Traction Lead-acid Batteries for Electric Bikes in China	LIU Wei, TIAN Jin-ping, CHEN Lü-jun	(3544)