

长期施用含氯化肥对棕壤硝化作用及氨氧化微生物的影响

马凌云, 王月*, 蔡芳芳, 张诗雨, 罗培宇, 杨劲峰, 韩晓日*

(沈阳农业大学土地与环境学院/土壤肥料资源高效利用国家工程实验室/
农业部东北玉米营养与施肥科学观测实验站, 辽宁沈阳 110866)

摘要:【目的】氨氧化微生物是氨氧化过程的主要驱动者, 氨氧化过程作为硝化作用的限速步骤对氮循环具有重要作用。本研究以沈阳农业大学棕壤含氯化肥长期定位试验的土壤为研究对象, 探讨了连续 34 年施用高氯和低氯化肥对棕壤硝化作用及氨氧化微生物的影响。【方法】该长期试验在等量氮、磷、钾条件下, 设置高氯和低氯处理, 共 8 个处理: T1 (不施肥); T2 (单施尿素); T3 (尿素 + 氯化钾); T4 (尿素 + 过磷酸钙); T5 (尿素 + 过磷酸钙 + 氯化钾); T6 (尿素 + 磷酸一铵 + 氯化钾); T7 (尿素 + 氯磷铵 + 氯化钾); T8 (硝酸磷肥 + 过磷酸钙 + 氯化钾), T7 为高氯处理。采集 0—20 cm 土壤样品, 利用荧光定量 PCR 技术测定氨氧化细菌 (AOB) 和古菌 (AOA) 丰度, 并结合土壤硝化潜势和基本化学性质, 分析长期施用含氯化肥对棕壤硝化作用及氨氧化微生物丰度的影响及影响氨氧化微生物丰度的主要环境因素。【结果】长期施肥降低了土壤 pH 值, 高氯处理降低得最多, 显著低于其他处理; 高氯处理的土壤硝化潜势也显著低于其他处理, 且除高氯处理外, 配施磷肥的处理土壤硝化潜势显著高于不施磷处理。各处理土壤中 AOA 丰度均显著高于 AOB, 高氯处理土壤中 AOA、AOB 丰度均显著低于其他处理, 土壤硝化潜势与 AOA 和 AOB 均呈显著正相关关系。【结论】连续施用高氯化肥 34 年显著降低了棕壤 AOA 和 AOB 丰度, 抑制了硝化潜势。该结果可为通过含氯化肥的合理施用来调节土壤 AOA 和 AOB, 进而调控土壤氮素循环提供参考。

关键词: 棕壤; 含氯化肥; 长期施肥; 硝化作用; 氨氧化古菌; 氨氧化细菌

Effects of long-term application of chlorinated fertilizer on nitrification and ammonia oxidizing microorganisms in brown soil

MA Ling-yun, WANG Yue*, CAI Fang-fang, ZHANG Shi-yu, LUO Pei-yu, YANG Jin-feng, HAN Xiao-ri*
(College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University/National Engineering Laboratory of High Efficient Use on Soil and Fertilizer Resources/Monitoring & Experimental Station of Corn Nutrition and Fertilization in Northeast China, Ministry of Agriculture, Shenyang 110866, China)

Abstract: 【Objectives】Ammonia-oxidizing microorganisms are the main drivers of ammonia oxidation process. Ammonia-oxidation process as a rate-limiting step of nitrification plays an important role in nitrogen cycle. We used the soil of a long-term experimental site in the brown soil of Shenyang Agricultural University, the effects of continuous application of high chloride and low chlorinated fertilizer on the nitrification and ammonia oxidizing microorganisms. 【Methods】The long-term experimental was carried out using equal amounts of N, P and K with high and low chlorine treatment, with a total of 8 treatments: T1, no fertilization control; T2, application of urea; T3, urea + potassium chloride; T4, urea + calcium superphosphate; T5, urea + calcium superphosphate + potassium chloride; T6, urea + monoammonium phosphate + potassium chloride; T7, urea + chloroammonium phosphate + potassium chloride; and T8, nitrophosphate fertilizer + superphosphate + potassium chloride. Among them, urea + chloroammonium phosphate + potassium chloride was high chlorine

收稿日期: 2018-08-14 接受日期: 2018-12-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41602363); 国家重点研发计划项目 (2018YFD03003, 2018YFD02010) 资助。

联系方式: 马凌云 E-mail: 184602971@qq.com

* 通信作者 王月 E-mail: wangyue1028@163.com; 韩晓日 E-mail: hanxiaori@163.com

treatment. The 0–20 cm soil samples were collected and the abundance of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and archaea (AOA) was determined by the real-time PCR. Combined with soil nitrification potential and basic chemical properties, analysis was conducted on the effects of long-term application of chlorinated fertilizer on the abundance of microorganisms and the main environmental factors affecting the abundance of ammonia-oxidizing microorganisms. **【 Results 】** Long-term fertilization reduced soil pH, especially with the high Cl treatment. In the high Cl treatment, soil nitrification potential was also significantly lower than other treatments. The nitrification potential of soil treated with phosphate fertilizer was significantly higher than that without phosphorus treatment. The abundance of AOA in each treated soil was significantly higher than that of AOB and the abundance of AOA and AOB in high Cl treated soil was significantly lower than other fertilization treatments, and the soil nitrification potential was significantly and positively correlated with AOA and AOB.

【 Conclusions 】 After 34 years of continuous application of high chloride fertilizer, the abundance of AOA and AOB in brown soil was significantly reduced, and the nitrification potential was inhibited. The test results can provide a reference for rational application of chloride fertilizers to regulate AOA and AOB, which in turn regulates soil nitrogen cycle.

Key words: brown soil; chlorinated fertilizer; long-term fertilization; nitrification; ammonia oxidation archaea; ammonia oxidizing bacteria

硝化作用是土壤氮素转化的主要途径之一, 由氨氧化 (NH_3 氧化成 NO_2^-) 和亚硝酸氧化 (NO_2^- 氧化成 NO_3^-) 两个步骤组成, 其中氨氧化过程是关键的限速步骤^[1], 会影响土壤氮的利用效率与损失, 对土壤氮循环起着重要作用。长久以来一直认为只有氨氧化细菌 (ammonia oxidation bacteria, AOB) 是氨氧化过程的主导者, 直至氨氧化古菌 (ammonia oxidation archaea, AOA) 被发现^[1], 并被证实一些土壤中 AOA 的数量和分布均较 AOB 更丰富, 在硝化作用中起主导作用^[2-3]。国内外众多学者在多种土壤上就施肥对氨氧化微生物的影响进行了深入、系统的研究。大量研究表明, 不同的土壤和施肥条件对土壤氨氧化过程影响不同, 目前较为一致的观点是土壤 pH、氨浓度、有机质等是影响土壤氨氧化微生物的主要因子。

然而近年来, 随着氯化铵和氯化钾等含氯化肥的广泛施用, 使大量的伴随离子—氯离子 (Cl^-) 进入农田生态系统, 参与了土壤和植物营养体系的物质循环。尽管 Cl^- 极易随水流失, 在土壤中的总残留率极低, 但长期积累还是使施氯处理土壤 Cl^- 含量显著增加^[4-5]。一些研究认为, 长期施用含氯化肥改变了土壤的理化性质、微生物活性和多样性^[4, 6-8]。有研究表明, 含氯化肥对硝化作用有抑制作用^[9], 但长期施用含氯化肥对硝化作用影响的报道较少。卢红霞^[10]通过土培试验研究了不同浓度 Cl^- 对滨海盐土、潮土、红壤中氮转化、土壤微生物数量的影响, 结果表明

凡施氯的处理亚硝酸细菌数量均明显减少。辜运富等^[11]研究认为, 施用 KCl 降低了土壤中硝化细菌的种群丰富度, 可能是由于 Cl^- 对硝化细菌形成毒害作用所致。秦子娟等^[7]研究也表明, 在中性紫色水稻土上经过 21 年施用含氯化肥, 氨氧化潜势显著低于 CK, 认为可能是由于该处理 pH 显著降低而不适合 AOB 的生长, 抑或是 Cl^- 本身对 AOB 产生抑制作用所致。以上研究只是关注了 AOB, 而未对在硝化过程中起重要作用的 AOA 进行研究。Zhou 等^[8]在紫色土上研究结果显示, 与其他处理相比, 长期施用含氯化肥+有机肥的处理具有更显著的 AOA 群落结构和丰富的多样性, 但该处理氨氧化潜势最低, 认为在紫色土中 pH 在控制 AOA 群落结构和氨氧化活性中起重要作用。可见含氯化肥对硝化作用的抑制机理并不明确, 在特定条件下, 研究在硝化作用中起关键作用的 AOB 和 AOA 对长期施用含氯化肥的响应, 可从微生物角度揭示含氯化肥抑制硝化作用的机理。

棕壤是辽宁省的主要耕作土壤之一, 面积约 7000 多万亩, 占全省耕作总面积的 36.32%, 是粮食的主产区。目前, 关于长期施用含氯化肥对棕壤中氨氧化微生物影响的报道较少。本研究以沈阳农业大学棕壤含氯化肥长期定位试验 (始于 1984 年) 为基础, 研究长期施用高氯和低氯化肥对棕壤 AOA、AOB 丰度以及氨氧化活性的影响, 通过分析土壤基本性质、氨氧化活性和 AOA、AOB 丰度的相关性, 探究影响棕壤 AOA、AOB 丰度的环境因子, 以进一

步认识施用含氯化肥对土壤硝化过程的影响及其机制,为含氯化肥的合理施用及氮素调控提供指导依据,确保农业的可持续发展。

1 材料与方法

1.1 试验设计

本研究土壤样品采自沈阳农业大学棕壤含氯化肥长期定位试验地 (40°48'N、123°33'E),为黄土性母质上发育的棕壤。该地属于温带湿润-半湿润季风气候,年平均气温 7~8.1℃,年降雨量为 574~684 mm。该试验始于 1984 年,开始供试作物为玉米-玉米-大豆轮作,自 2009 年开始改为玉米-花生轮作,一年一季。共设置 8 个处理: T1 (不施肥); T2 (单施尿素); T3 (尿素 + 氯化钾); T4 (尿素 + 过磷酸钙); T5 (尿素 + 过磷酸钙 + 氯化钾); T6 (尿素 + 磷酸一铵 + 氯化钾); T7 (尿素 + 氯磷铵 + 氯化钾); T8 (硝酸磷肥 + 过磷酸钙 + 氯化钾)。除 CK 外,各处理施用等量氮、磷、钾,其中 T1、T2、T4 为不施氯处理, T3、T5、T6、T8 为低氯处理, T7 为高氯处理。氮、磷、钾肥混合均匀,均做基肥一次施入。微区面积为 2 m²,每个处理重复 3 次,完全随机区组排列。2009 年后各处理具体施肥量如表 1。

1.2 土壤样品的采集与处理

2017 年种植花生,品种为‘花育 20’; 2018 年种植玉米,品种为‘东单 6531’。于 2018 年 4 月种植前采集 0—20 cm 土壤样品。每个小区“S”形取 5 点土样均匀混合后,装入无菌塑料袋内用冰盒保持低温带回实验室,同时用铝盒采集土样进行含水量测定。将土样去除植物残体等杂质后过 2 mm 筛,分成三部分:一部分置于-80℃冰箱,用于 DNA 提取及

后续氨氧化微生物丰度测定;一部分于 4℃冰箱保存,并尽快测定铵态氮 (NH₄⁺-N)、硝态氮 (NO₃⁻-N) 含量及土壤硝化潜势;其余样品风干,用于测定土壤氯离子 (Cl⁻) 含量及其他基本化学性质。

1.3 试验方法

土壤 pH 的测定以水土比 2.5 : 1 浸提,用 pH 计 (上海雷磁, PHS-3C) 进行测定。

土壤中氯离子含量采用莫尔法测定。土壤中 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 用 0.01 mol/L 氯化钙 (液土比 = 10 : 1) 浸提后,用 AA3 多通道流动分析仪 (德国 SEAL, AutoAnalyzer3) 测定。其他基本化学性质按照常规方法^[12]进行测定。土壤硝化潜势的测定采用氯酸盐抑制法^[13]:以水土比 4 : 1 向 5 g 土壤中加入含 1 mmol/L (NH₄)₂SO₄ 的磷酸盐缓冲液 (NaCl 8.0 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 0.2 g/L, NaH₂PO₄ 0.2 g/L; pH 值 7.4), 并加入 10 mmol/L KClO₃ 溶液抑制亚硝酸盐的氧化。土样于 25℃ 黑暗培养 24 h 后加入 5 mL 2 mol/L KCl 溶液浸提 NO₂⁻-N。NO₂⁻以 N-(1-萘基)-乙二胺显色,在 540 nm 波长下测定。硝化潜势用单位时间内单位土壤产生的 NO₂⁻-N 表示。

土壤总 DNA 提取: 采用 Dneasy PowerSoil 土壤微生物 DNA 提取试剂盒 (QIAGEN GmbH, Germany) 提取,所得 DNA 样品于-20℃冰箱中保存待用。

氨氧化细菌和氨氧化古菌丰度分析^[14]:以氨氧化细菌 (AOB) *amoA* 基因和氨氧化古菌 (AOA) *arch-amoA* 基因的拷贝数分别表示 AOB 和 AOA 的丰度。利用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术检测 *amoA* 和 *arch-amoA* 基因拷贝数,每个样品重复 3 次。AOB 的引物为 *amoA*-1F (5'-GGGGTTTCTACTGTGGT-3') 和 *amoA*-2R (5'-CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC-3'), 反应程序为预变性 95℃ 30 s, 94℃ 变性 10 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环; AOA 的引物为 *arch-amoA*F (5'-STAATGGTCTGGCTTAG-ACG-3') 和 *arch-amoA*R (5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3'), 反应程序为预变性 95℃ 30 s, 94℃ 变性 10 s, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 40 个循环。采用 TB Green™ Premix Ex Taq™ (2 ×) (Takara, 大连) 试剂盒, Real-time PCR 反应体系为 20 μL, 其中 DNA 模板 1 μL, 19 μL 反应液, 反应液包括 10 μL 2 × TB Green、上下游引物各 1 μL, 灭菌超纯水 7 μL。标准曲线以黑龙江黑土提取的 DNA 为模板进行 AOA *arch-amoA* 基因和 *amoA* 基因克隆制备质粒。将质粒连续稀释 6 个数量级作为标曲, 其中 AOA 扩增效率为 0.9, AOB 扩增效率为 1.04。

表 1 2009 年后种植玉米/花生年份各处理肥料施用量

Table 1 Application rates of fertilizers in maize/peanut of each treatment after 2009 (kg/hm²)

处理 Treatment	N	P ₂ O	K ₂ O	Cl
T1	0/0	0/0	0/0	0/0
T2	120.1/37.5	0/0	0/0	0/0
T3	120.1/37.5	0/0	60/37.5	47.7/29.8
T4	120.1/37.5	60/112.5	0/0	0/0
T5	120.1/37.5	60/112.5	60/37.5	47.7/29.8
T6	120.1/37.5	60/112.5	60/37.5	47.7/29.8
T7	120.1/37.5	60/112.5	60/37.5	321/162
T8	120.1/37.5	60/112.5	60/37.5	47.7/29.8

1.4 数据处理

数据采用 PASW statistics18、Excel、Canoco 等软件进行统计分析处理。

2 结果与分析

2.1 不同施肥处理对土壤基本化学性质的影响

不同施肥处理对土壤基本化学性质的影响较大(表 2)。其中, 初始土为 1984 年耕层土壤。经过 34 年连续施用含氯化肥, 土壤 Cl⁻含量为高氯处理 > 低氯处理 > 不施氯处理, 施氯的土壤 Cl⁻含量显著高于不施氯的处理, 其中高氯处理土壤 Cl⁻含量为 43.62 mg/kg, 显著高于其他处理, 是 T1 处理的 3.5 倍。与 T1 相比, 所有施肥处理的土壤 pH 均显著降低, 且高氯处理土壤 pH 最低为 5.27, 显著低于其他处理; 其次是 T2、T3 处理, 配施过磷酸钙的 T4、T5、T8 三个处理之间 pH 差异不显著, 但显著高于 T2、T3 处理。施肥处理的土壤全氮、有机质均高于 T1 处理, 施用含氯化肥对这 2 种养分含量影响较小。高氯处理土壤中碱解氮、速效磷、速效钾含量均最高, 分别为 91.01、24.88、131.05 mg/kg, 其中速效磷含量显著高于其他处理。

2.2 不同施肥处理对土壤硝化作用的影响

2.2.1 不同施肥处理对土壤铵态氮、硝态氮的影响

图 1 表明, 除 T5、T8 处理外, 其他施肥处理 NH₄⁺-N

含量明显高于不施肥处理, 其中 T8 的 NH₄⁺-N 含量最低, 与 T1 处理相比下降了 15.2%。高氯处理 T7 的 NH₄⁺-N 含量最高为 3.40 mg/kg, 是 T1 处理的 2 倍, 且与其他处理差异显著。

不同施肥处理对土壤 NO₃⁻-N 含量影响较大, NO₃⁻-N 含量为 10.02~15.38 mg/kg。其中 T4 处理 NO₃⁻-N 含量最高, 与 T1 处理相比提高了 10.17%。T3 处理 NO₃⁻-N 含量显著高于其他低氯处理, 与 T1、T4 处理间差异不显著, 而低氯处理 T5、T6 和高氯处理 T7 间 NO₃⁻-N 含量没有显著差异。

2.2.2 不同施肥处理对土壤硝化潜能的影响 土壤硝化潜能可以用来表征土壤的氨氧化能力。由图 2 可见, 不同处理的土壤硝化潜能范围为 1.48~4.48 mg/(kg·d), 处理间差异显著。其中高氯处理 T7 的土壤硝化潜能最低, 显著低于其他处理, 与 T4 相比降低了 74.6%。与 T1 相比, T2、T3 处理硝化潜能降低, 但差异不显著; 除高氯处理外, 配施磷肥的 T4、T5、T6、T8 几个处理的硝化潜能显著高于未施磷肥的 T1、T2、T3 处理, 且 T4 处理的土壤硝化潜能最高为 4.48 mg/(kg·d), 与 T1 处理相比提高了 60%。

2.3 不同施肥处理对土壤 AOA、AOB 丰度的影响

通过实时荧光定量 PCR 技术对 AOA 与 AOB 的 amoA 基因拷贝数进行了测定分析。从图 3 可以看出, 各处理土壤中 AOA 丰度均显著高于 AOB 的丰度, 且不同施肥处理土壤中氨氧化微生物丰度差异

表 2 不同处理的土壤基本化学性质

Table 2 Basic chemical properties of the tested soil in different treatments

处理 Treatment	Cl ⁻ (mg/kg)	pH	全氮 (g/kg) Total N	有机质 (g/kg) SOM	碱解氮 (mg/kg) Alk-hydr. N	速效磷 (mg/kg) Available P	速效钾 (mg/kg) Available K
初始土 Initial soil	24	6.11	0.90	16.2	99	6.5	125.85
T1	12.33 ± 0.39 e	6.77 ± 0.08 a	0.82 ± 0.005 c	16.50 ± 0.14 c	72.65 ± 1.2 d	1.72 ± 0.08 d	83.30 ± 1.4 c
T2	13.12 ± 0.38 e	5.66 ± 0.06 d	0.84 ± 0.014 bc	17.02 ± 0.37 bc	83.61 ± 2.1 bc	2.48 ± 0.04 d	80.43 ± 3.2 c
T3	17.55 ± 0.74 d	5.59 ± 0.03 d	0.87 ± 0.012 ab	17.19 ± 0.27 bc	79.94 ± 0.8 c	1.35 ± 0.05 d	122.88 ± 6.1 a
T4	14.22 ± 0.57 e	6.10 ± 0.04 bc	0.86 ± 0.009 ab	18.09 ± 0.37 ab	86.97 ± 2.8 ab	22.73 ± 0.7 b	76.05 ± 2.5 c
T5	22.5 ± 0.76 bc	5.95 ± 0.009 c	0.88 ± 0.02 a	18.93 ± 0.71 a	90.21 ± 1.9 a	22.62 ± 0.9 b	106.70 ± 4.4 b
T6	22.7 ± 0.29 b	6.15 ± 0.07 b	0.85 ± 0.013 ab	18.01 ± 0.44 ab	84.01 ± 1.5 bc	10.96 ± 0.4 c	110.40 ± 1.7 b
T7	43.62 ± 1.02 a	5.27 ± 0.06 e	0.88 ± 0.006 a	18.70 ± 0.28 a	91.01 ± 1.7 a	24.88 ± 0.6 a	131.05 ± 3.8 a
T8	20.64 ± 0.57 c	5.99 ± 0.03 c	0.85 ± 0.007 abc	17.73 ± 0.21 ab	88.76 ± 1.8 ab	21.22 ± 0.7 b	110.98 ± 3.2 b

注 (Note): 同列数据后不同字母表示差异显著 Values followed by different letters in the same column are significantly different among the treatments (LSD method, α = 0.05); T1—不施肥 No fertilization control; T2—单施尿素 Application of urea; T3—尿素 + 氯化钾 Urea + potassium chloride; T4—尿素 + 过磷酸钙 Urea + calcium superphosphate; T5—尿素 + 过磷酸钙 + 氯化钾 Urea + calcium superphosphate + potassium chloride; T6—尿素 + 磷酸一铵 + 氯化钾 Urea + monoammonium phosphate + potassium chloride; T7—尿素 + 氯磷铵 + 氯化钾 Urea + chloroammonium phosphate + potassium chloride; T8—硝酸磷肥 + 过磷酸钙 + 氯化钾 Nitrophosphate fertilizer + calcium superphosphate + potassium chloride.

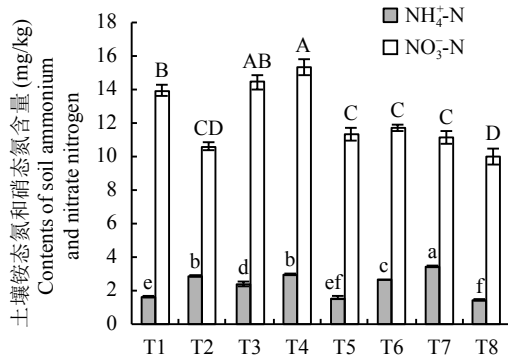


图1 不同施肥处理土壤铵态氮、硝态氮含量

Fig. 1 Contents of soil ammonium and nitrate nitrogen in different treatments

[注 (Note): 方柱上不同小写、大写字母分别代表铵态氮、硝态氮含量各处理间在 0.05 水平差异显著 Different lowercase and capital letters above the bars represent significant differences of NH₄⁺-N and NO₃⁻-N contents among treatments ($\alpha = 0.05$); T1—不施肥 No fertilization control; T2—单施尿素 Application of urea; T3—尿素 + 氯化钾 Urea + potassium chloride; T4—尿素 + 过磷酸钙 Urea + calcium superphosphate; T5—尿素 + 过磷酸钙 + 氯化钾 Urea + calcium superphosphate + potassium chloride; T6—尿素 + 磷酸一铵 + 氯化钾 Urea + monoammonium phosphate + potassium chloride; T7—尿素 + 氯磷铵 + 氯化钾 Urea + chloroammonium phosphate + potassium chloride; T8—硝酸磷肥 + 过磷酸钙 + 氯化钾 Nitrophosphate fertilizer + calcium superphosphate + potassium chloride.]

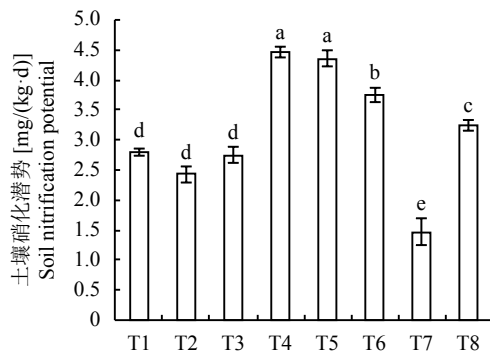


图2 不同施肥处理土壤硝化潜势

Fig. 2 Soil nitrification potential in different treatments

[注 (Note): 方柱上不同字母表示各处理在 0.05 水平差异显著 Different letters above the bars indicate significantly different among the treatments ($\alpha = 0.05$); T1—不施肥 No fertilization control; T2—单施尿素 Application of urea; T3—尿素 + 氯化钾 Urea + potassium chloride; T4—尿素 + 过磷酸钙 Urea + calcium superphosphate; T5—尿素 + 过磷酸钙 + 氯化钾 Urea + calcium superphosphate + potassium chloride; T6—尿素 + 磷酸一铵 + 氯化钾 Urea + monoammonium phosphate + potassium chloride; T7—尿素 + 氯磷铵 + 氯化钾 Urea + chloroammonium phosphate + potassium chloride; T8—硝酸磷肥 + 过磷酸钙 + 氯化钾 Nitrophosphate fertilizer + calcium superphosphate + potassium chloride.]

显著。AOA 丰度为 $1.53 \times 10^7 \sim 5.53 \times 10^7$ copies/g 干土, AOB 丰度为 $7.91 \times 10^5 \sim 1.99 \times 10^6$ copies/g 干土。

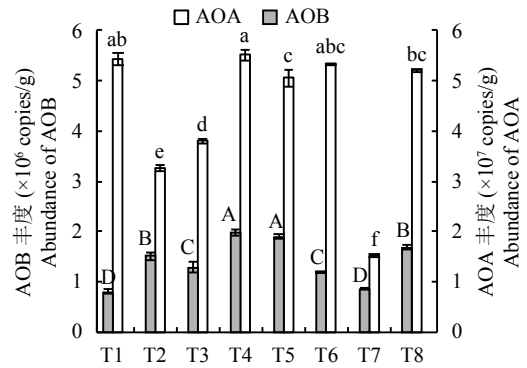


图3 不同施肥处理对土壤 AOA、AOB 丰度的影响

Fig. 3 Abundance of archaeal and bacteria amoA gene in soils in different treatments

[注 (Note): 方柱上不同小写、大写字母分别代表 AOA、AOB 丰度各处理间在 0.05 水平差异显著 Different lowercase and capital letters represent significant differences of AOA and AOB abundance among treatments ($\alpha = 0.05$); T1—不施肥 No fertilization control; T2—单施尿素 Application of urea; T3—尿素 + 氯化钾 Urea + potassium chloride; T4—尿素 + 过磷酸钙 Urea + calcium superphosphate; T5—尿素 + 过磷酸钙 + 氯化钾 Urea + calcium superphosphate + potassium chloride; T6—尿素 + 磷酸一铵 + 氯化钾 Urea + monoammonium phosphate + potassium chloride; T7—尿素 + 氯磷铵 + 氯化钾 Urea + chloroammonium phosphate + potassium chloride; T8—硝酸磷肥 + 过磷酸钙 + 氯化钾 Nitrophosphate fertilizer + calcium superphosphate + potassium chloride.]

高氯处理 T7 的 AOA 丰度最低且显著低于其他处理, 与 T1 相比降低了 71.9%。T2、T3 处理 AOA 丰度也较 T1 处理显著降低, 分别降低了 39.9% 和 30.2%, T4 处理与 T1 处理差异不显著。除高氯处理外, 同时施用氮磷钾肥的 T5、T6、T8 三个处理 AOA 丰度均低于 T1 处理, 但显著高于 T2、T3 处理。与 T1 相比, 除高氯处理外, 各施肥处理均显著增加了土壤中 AOB 的丰度。高氯处理的 AOB 丰度最低, 与 T1 差异不显著。与 AOA 类似, T4 处理的土壤中 AOB 丰度最高为 1.99×10^6 copies/g 干土, 与 T5 差异不明显, 但显著高于其他处理, 比 T1 处理提高了 151%。

2.4 AOA、AOB 丰度与土壤化学性质、硝化潜势的相关性

由表 3 可知, 不同施肥处理土壤 AOA 丰度、AOB 丰度与土壤硝化潜势均呈显著正相关关系, 且与 AOA 呈极显著正相关关系。AOA 丰度与土壤 pH 呈极显著正相关, 相关系数为 0.835, 而 AOB 丰度与土壤 pH 无显著相关性。土壤 AOA 丰度、AOB 丰度与其他土壤化学性质均无显著相关性。

由冗余分析 (图 4) 也可看出, 施用含氯化肥 34

表 3 AOA、AOB 丰度与土壤化学性质、硝化潜势的相关性

Table 3 Correlation coefficient among AOA and AOB abundance and soil chemical properties

丰度 Abundance	碱解氮 Alk-hydr. N	速效磷 Avail. P	速效钾 Avail. K	pH	有机质 SOM	全氮 Total N	氯离子 Cl ⁻	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N	硝化潜势 PNR
AOA	-0.291	-0.047	-0.499	0.835**	-0.177	-0.421	-0.679	-0.638	0.308	0.835**
AOB	0.497	0.407	-0.334	-0.048	0.353	0.295	-0.362	-0.201	0.002	0.741*

注 (Note): PNR—Potential nitrification rate. *— $P < 0.05$; **— $P < 0.01$.

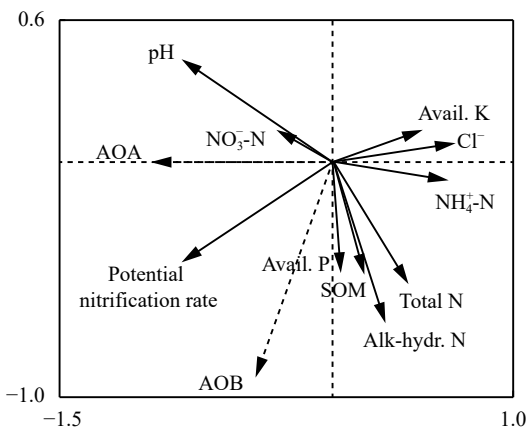


图 4 土壤氨氧化微生物与基本化学性质的冗余分析

Fig. 4 Relationship among soil cochemical properties and ammonia-oxidizing microorganisms in soil described with redundancy analysis

[注 (Note): 环境因子之间的夹角为锐角时表示两个环境因子之间呈正相关关系, 钝角时呈负相关关系 Acute and obtuse angles between any two factors indicate the positive and negative correlation of them, respectively; 环境因子的射线越长, 说明该影响因子的影响程度越大 The longer the radiation of the environmental factoris, the greater the impact of the impact factoris.]

年后, AOA 和 AOB 丰度均对土壤硝化潜势产生明显影响, 土壤 pH 仅对 AOA 丰度有明显影响, 而速效磷、速效钾、碱解氮等其他化学性质对土壤氨氧化微生物丰度无显著影响。

3 讨论

3.1 长期施用含氯化肥对土壤化学性质和硝化作用的影响

连续施用含氯化肥 34 年后, 土壤基本性质发生了显著变化。尽管高氯处理土壤中 Cl⁻ 含量显著增加, 但不会对作物产生危害, 因其浓度远低于作物耐氯临界值^[15]。长期施用含氯化肥降低了土壤 pH, 邹长明等^[16]、侯小娟等^[17]研究也表明, 长期施用含氯化肥土壤 pH 有下降趋势, 会造成土壤酸化, 与本试验结果一致。其中高氯处理降低得更多, 显著低于其他处理, 与 T1 相比降低了 22.16%。这与吴金桂

等^[18]的研究结果类似。造成土壤酸化的原因, 一方面是由于含氯肥料为生理酸性肥料, 长期施用会导致土壤 pH 下降; 另一方面可能是由于氯能抑制铵态氮的硝化作用^[9], 而使作物在吸收铵态氮的同时, 释放出大量氢离子, 提高了土壤的酸度。除高氯处理外, 配施磷肥的几个处理缓解了土壤酸化。速效氮、磷、钾均在高氯处理的土壤含量最高, 李海云等^[19]研究也表明, 含氯化肥有利于土壤中速效氮、磷、钾积累。

本研究中, 高氯处理的土壤 NH₄⁺-N 含量显著高于其他处理, 且硝化潜势最低。表明施高氯抑制了土壤硝化作用, 使更多的氮素以铵的形式存在, 这与周丕东等^[20]的研究结果一致。这应该是由于高氯处理土壤 pH 显著降低, 影响了土壤中硝化微生物的活性导致硝化作用减弱^[21], 或是高浓度的 Cl⁻ 对氨氧化微生物产生了毒害作用所致^[11]。除高氯处理外, 其他配施磷肥的处理硝化潜势均显著高于未施磷肥的处理, T4 > T2, T5 > T6 > T8 > T3, 其中 T4 处理硝化潜势最高, 说明施用磷肥促进了土壤的硝化潜势, 这与以往的研究结果一致^[8, 14, 22-23]。T1、T2、T3 处理之间硝化潜势没有差异, 而且这些处理中速效磷含量相对较低, 进一步表明磷可能是土壤硝化潜势的限制因子, 这与 Zhou 等^[8]在紫色土上的研究结果类似。

3.2 长期施用含氯化肥对土壤 AOA、AOB 丰度的影响

在所有处理中, 氨氧化古菌 AOA *amoA* 基因的丰度 ($1.53 \times 10^7 \sim 5.53 \times 10^7$ copies/g) 均显著高于氨氧化细菌 AOB ($7.91 \times 10^5 \sim 1.99 \times 10^6$ copies/g), 二者比值为 18.0~68.8, 土壤中 AOA 的数量明显多于 AOB, 这与罗培宇等^[24]在棕壤上的研究结果一致。AOA 的数量及 AOA 与 AOB 数量的比值均与土壤 pH 呈极显著正相关关系 ($r = 0.835^{**}$, $r = 0.894^{**}$, $P < 0.01$), 即随土壤 pH 的增加而增加, 而 AOB 的数量与 pH 之间没有相关性。李秀玲^[25]在棕壤上的研究也认为, AOA 的丰度与土壤 pH 呈显著正相关关系, 与本研

究结果一致,而张苗苗等^[14]在南方酸性红壤上的研究结果显示 AOA 的数量及 AOA 与 AOB 数量的比值随土壤 pH 的增加而降低,与本研究结果相反,这可能是由于土壤类型不同而造成的差异。本研究中施用高氯的处理 AOA 和 AOB 的丰度均显著低于其他施肥处理,可能是由于高氯处理进一步降低了土壤的 pH,致使 AOA 和 AOB 的数量降低,或是该处理中累积的高浓度氯离子对氨氧化微生物产生了抑制作用,其具体机理还有待进一步验证。除高氯处理外,其他配施磷肥的处理 AOA 的数量均显著高于不施磷处理,AOB 的数量也是除 T6 和 T7 处理外施磷处理显著高于不施磷处理,这说明磷也会影响土壤中氨氧化微生物,这与以往的研究结果类似^[14]。

4 结论

经过 34 年连续施用含高氯化肥显著增加了棕壤中 Cl⁻ 含量,并且显著降低了土壤 pH,加重了土壤的酸化。施用高氯化肥还显著降低了土壤中 AOA 和 AOB 的丰度,减弱了土壤的硝化潜势,抑制了硝化作用。土壤 pH 仅对土壤中 AOA 丰度具有显著影响,对 AOB 丰度没有明显影响。

参考文献:

- [1] K  nneke M, Bernhard A E, Torre J R, *et al.* Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon[J]. *Nature*, 2005, 437(7058): 543–546.
- [2] Leininger S, Urich T, Schloter M, *et al.* Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. *Nature*, 2006, 442: 806–809.
- [3] 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: 1032–1045.
- [4] 邹长明, 高菊生, 王伯仁, 等. 长期施用含氯化肥对水稻生长和养分吸收的影响[J]. *土壤肥料科学*, 2004, 20(6): 182–184, 195.
Zou C M, Gao J S, Wang B R, *et al.* Effects of long-term application of chlorinated fertilizer on rice growth and nutrient absorption[J]. *Science of Soil and Manure*, 2004, 20(6): 182–184, 195.
- [5] 蒋增, 韩晓日, 杨劲峰, 等. 长期施用含氯化肥对土壤养分及花生产量的影响[J]. *沈阳农业大学学报*, 2011, 42(2): 204–207.
Jiang Z, Han X R, Yang J F, *et al.* Effects of long-term application of chloride-containing fertilizers on soil nutrients and peanut yield[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2011, 42(2): 204–207.
- [6] 侯晓娟, 徐明岗, 李冬初, 等. 长期施用含硫含氯化肥稻田土壤化学性质的演变特征[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(12): 2460–2468.
Hou X J, Xu M G, Li D C, *et al.* Evolution characteristics of long-term application of sulfur-containing chlorinated fertilizers in paddy soils[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(12): 2460–2468.
- [7] 秦子娴, 张宇亭, 周志峰, 等. 长期施肥对中性紫色水稻土氮素矿化和硝化作用的影响[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(16): 3392–3400.
Qin Z X, Zhang Y T, Zhou Z F, *et al.* Effects of long-term fertilization on nitrogen mineralization and nitrification in neutral purple paddy soil[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(16): 3392–3400.
- [8] Zhou Z F, Shi X J, Zheng Y, *et al.* Abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in purple soil under long-term fertilization[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2014, 60: 24–33.
- [9] Fu J C, Woodard H J, Hossner L R. Nitrification in high chloride zones near fertilizer bands in a calcareous soil[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 1994, 17(4): 607–629.
- [10] 卢红霞. 氯(Cl⁻)对马铃薯的某些生理效应及对土壤中氮肥行为的影响[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2001.
Lu H X. Effects of chlorine (Cl⁻) on some physiological effects of potato and nitrogen fertilizer behavior in soil[D]. Hangzhou: MS Thesis of Zhejiang University, 2001.
- [11] 辜运富, 张小平, 涂仕, 等. 长期定位施肥对紫色水稻土硝化作用及硝化细菌群落结构的影响[J]. *生态学报*, 2008, 28(5): 2123–2130.
Gu Y F, Zhang X P, Tu S, *et al.* Effects of long-term fertilization on nitrification of purple paddy soil and community structure of nitrifying bacteria[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(5): 2123–2130.
- [12] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
Bao S D. Analytical methods of soil and agricultural chemistry[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000.
- [13] Kurola J, Salkinoja-Salonen M, Aarnio T, *et al.* Activity, diversity and population size of ammonia-oxidizing bacteria in oil-contaminated landfarming soil[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 250(1): 33–38.
- [14] 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 application of nitrogen fertilizer and calcium oxide regulation on acid soil nitrification and ammonia oxidation microorganisms[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(19): 6362–6370.
- [15] 毛知耘, 李家康, 何光安. 中国含氯化肥[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
Mao Z Y, Li J K, He G A. Chlorine containing fertilizers in China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001.
- [16] 邹长明, 高菊生. 长期施用含氯化肥对稻田土壤氯积累及养分平衡的影响[J]. *生态学报*, 2004, 24(1): 2557–2563.
Zou C M, Gao J S. Effects of long-term application of chlorine-containing chemical fertilizers on chloride accumulation and nutrient balance in paddy fields[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(1): 2557–2563.
- [17] 侯晓娟, 徐明岗, 李冬初, 等. 长期施用含硫含氯化肥稻田土壤化学性质的演变特征[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(12): 2460–2468.
Hou X J, Xu M G, Li D C, *et al.* Evolution of the soil chemical properties in paddy field under long-term application of sulfur-containing and chloride containing fertilizers[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(12): 2460–2468.

- [18] 吴金桂, 姜德仁, 宁运旺, 等. 对含氯化肥农田应用效果的评价[J]. *土壤学报*, 1995, 32(3): 321–325.
Wu J G, Lou D R, Ning Y W, *et al.* Evaluation on efficiency of choride-bearing fertilizer applied in farmland[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 1995, 32(3): 321–325.
- [19] 李海云, 王秀峰. 不同阴离子化肥对设施土壤理化性状的影响研究[J]. *中国生态农业学报*, 2004, 12(4): 126–128.
Li H Y, Wang X F. Effects of different anionic fertilizers on soil physical and chemical properties of facility[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2004, 12(4): 126–128.
- [20] 周丕东, 石孝均, 毛知耘, 等. 氯化铵中氯的硝化抑制效应研究[J]. *植物营养与肥科学报*, 2001, 7(4): 397–403.
Zhou P D, Shi X J, Mao Z Y, *et al.* Study on nitrification inhibition effect of chlorine in ammonium chloride[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2001, 7(4): 397–403.
- [21] 朱兆良, 文启孝. 中国土壤氮素[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1992.
Zhu Z L, Wen Q X. Nitrogen in Chinese soils[M]. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press, 1992.
- [22] 武传东, 辛亮, 李秀颖, 等. 长期施肥对黄土旱塬黑垆土氨氧化古菌群落多样性和丰度的影响[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(20): 4230–4239.
Wu C D, Xin L, Li X Y, *et al.* Effects of long-term fertilization on the diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea in black soil of loess plateau[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(20): 4230–4239.
- [23] 赵浩淳, 周志峰, 秦子娴, 郭涛. 施磷处理对中性紫色土土壤硝化作用的影响[J]. *土壤学报*, 2016, 53(1): 271–275.
Zhao H C, Zhou Z F, Qin Z X, Guo T. Influence of phosphorus application on nitrification of neutral purple soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53(1): 271–275.
- [24] 罗培宇, 樊耀, 杨劲峰, 等. 长期施肥对棕壤氨氧化细菌和古菌丰度的影响[J]. *植物营养与肥科学报*, 2017, 23(3): 678–685.
Luo P Y, Fan Y, Yang J F, *et al.* Influence of long-term fertilization on abundance of ammonia oxidizing bacteria and archaeal in brown soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2017, 23(3): 678–685.
- [25] 李秀玲. 不同施肥处理棕壤中氨氧化微生物丰度及其种群多样性特征[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士论文, 2017.
Li X L. Ammonia microbial abundance and population diversity of brown soil under different fertilization treatments[D]. Shenyang: MS Thesis of Shenyang Agricultural University, 2017.