

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.03.023

# pH 对酸性紫色土中硝化作用 与硝化微生物的影响<sup>①</sup>

苏 静, 王智慧, 李仕伟, 谢德体, 蒋先军

西南大学 资源环境学院, 重庆 400716

**摘要:** 硝化作用是对 pH 高度敏感的典型生物学过程. 本实验以重庆市永川区 pH=3.8 的紫色土为研究对象, pH=6.5 紫色土为对照, 通过室内培养实验研究了土壤硝化动力学过程, 并采用荧光实时定量 PCR 技术对土壤氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)定量. 结果显示: pH=3.8 的紫色土净硝化速率为 0.56 mg/(kg·d)(全文均以 N 质量分数计), 而 pH=6.5 紫色土的净硝化速率是 pH=3.8 紫色土的 12.8 倍, 为 7.14 mg/(kg·d). 研究同时发现不同 pH 的紫色土均符合一级动力学方程, 动力学拟合参数表明 pH 高的紫色土具有更高的潜在硝化速率. 硝化反应底物  $\text{NH}_3$  质量分数随土壤 pH 增加呈数量级增加, 经计算 pH=6.5 紫色土中  $\text{NH}_3$  质量分数为  $1.08 \times 10^{-1}$  mg/kg, 是 pH=3.8 紫色土( $2.46 \times 10^{-4}$  mg/kg)的 439 倍. 土壤中 AOB, AOA 丰度测定显示, pH=3.8 紫色土中 AOB, AOA 的氨单加氧酶(*amoA*)基因拷贝数分别为  $3.23 \times 10^6$ ,  $7.17 \times 10^6$ /g 干土, 而 pH=6.5 的紫色土中 AOB, AOA 的 *amoA* 基因拷贝数分别为  $3.58 \times 10^7$ ,  $1.67 \times 10^8$ /g 干土. 虽然结果显示 pH=6.5 的紫色土中氨氧化微生物丰度明显高于 pH=3.8 的紫色土, 但 pH=3.8 的紫色土中氨氧化微生物仍有较高的硝化潜力. 结论认为, pH 主要通过影响硝化底物  $\text{NH}_3$  质量分数而直接影响紫色土的硝化强度.

**关键词:** 硝化动力学; 实时荧光定量 PCR; *amoA* 基因

**中图分类号:** S154.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2017)03-0142-07

硝化过程是对 pH 高度敏感的典型生物学过程<sup>[1-2]</sup>. 由于氨单加氧酶只能催化非离子态氨( $\text{NH}_3$ )氧化, 不能催化离子态铵( $\text{NH}_4^+$ )氧化<sup>[3]</sup>. 而酸性土壤中  $\text{NH}_3$  质量分数很低<sup>[4]</sup>, 所以一直以来科学家们认为硝化过程不能在酸性土壤中发生<sup>[5]</sup>. 但随后越来越多证据表明酸性土壤中存在硝化作用<sup>[6-7]</sup>. 20 世纪末, Dahlgren, Stark 和 Hart 分别在 Nature 发表论文, 首次以确凿证据证明酸性土壤中存在强烈的硝化作用<sup>[8-9]</sup>. 与此同时, 许多酸性土壤尚未找到硝化作用存在的证据<sup>[1]</sup>.

氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)都具有能产生催化氨氧化过程的氨单加氧酶(AMO)基因, 这表明它们在硝化过程中起着至关重要的作用<sup>[10-11]</sup>, 但氨氧化细菌和古菌群落在硝化作用中的相对贡献仍存在争议. Tourna 等<sup>[12]</sup>和 Offre 等<sup>[13]</sup>研究表明 AOA 在土壤硝化作用中起重要作用, 而在农业土壤<sup>[14]</sup>和其他 N 素丰富的草原土壤<sup>[15]</sup>中 AOB 比 AOA 具有更高的氨氧化活性. 这些研究结果的对比表明, AOB, AOA 的相对重要性与土壤环境和实地条件密切相关<sup>[16]</sup>.

紫色土是我国南方重要的旱作土壤之一, 在四川、重庆和云南 3 个省市分布较广, 占全国紫色土总面

① 收稿日期: 2015-01-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(41271267).

作者简介: 苏 静(1989-), 女, 四川广安人, 硕士, 主要从事土壤肥力与生态学研究.

通信作者: 蒋先军, 教授, 博士研究生导师.

积的 74.9%。其中酸性紫色土, 占全国紫色土面积的 42.2%, 有  $9.22 \times 10^6 \text{ hm}^2$  [17]。土壤酸化是土壤退化的重要形式, 易导致土壤肥力和环境质量的降低。近 20 年间重庆地区受酸沉降影响, 紫色土已发生大面积酸化 [18], 而氮肥的长期施用对土壤酸化的影响超过了酸沉降 [19-20]。紫色土结构疏松, 易侵蚀, 硝酸盐淋溶强烈。硝酸盐大量淋失则来自于硝化作用, 所以研究酸性紫色土壤中硝化作用, 既是农业实践中合理施肥以提高氮肥利用率所必需, 也可为水环境质量控制提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试土壤

以重庆市永川区(29°N, 105°E)为采样点。供试地点属中亚热带湿润季风气候, 雨量充沛。年平均气温 17.7 °C, 无霜期 320d, 年均降水量 1 033 mm。土壤分别采自永川区吉安镇低山丘陵中下部梨园地(pH=3.8 的紫色土)和大安镇丘陵中部玉米地(pH=6.5 的紫色土)。土壤基本理化性质见表 1 [21]。采用多点混合采样法采集表层(0~20 cm)土壤, 每个土样 3 个重复。将所采集土样粉碎、风干, 剔除其中石块、草根等杂物, 过 2 mm 筛备用。

表 1 土壤基本理化性质

pH	有机质/ (g · kg <sup>-1</sup> )	全 N/ (g · kg <sup>-1</sup> )	全 P/ (g · kg <sup>-1</sup> )	全 K/ (g · kg <sup>-1</sup> )	有效氮/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/ (mg · kg <sup>-1</sup> )
3.8	24.8	1.50	0.515	9.53	136	36.1	4.53
6.5	20.1	1.43	0.975	23.8	106	31.9	28.6

### 1.2 培养实验

分别称取 pH=3.8, 6.5 风干土样 250g 于培养皿中(3 个重复), 控制含水量为田间最大持水量(WHC)的 60%, 置于 28 °C 恒温箱中预培养 1 d [22-23]。预培养后淋洗土样至 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 质量分数小于 10 mg/kg, 略微风干备用 [24]。

分别称取相当于 20 g 干土的上述土样于 150 mL 的三角瓶中(3 个重复), 调节土样含水量为 WHC 的 60%, 按 5 mmol/kg 加入氮源(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [23], 保证 N 源充足。瓶口用聚乙烯薄膜封口扎孔, 放入 28 °C 恒温培养箱中培养 [22-23]。于第 0, 1, 3, 7, 10, 13 天取样测定土壤 pH、硝态氮、铵态氮。

### 1.3 测定方法

#### 1.3.1 无机氮及 pH 测定

pH 是采用酸度计在 1:2.5 土水比的悬浊液条件下测定。矿质氮用 Bremner 法浸取, 即用 2 mol/L 的 KCl 溶液在土水比为 1:10, 转速为 200 r/min 下振荡 1 h, 将振荡后的悬浊液过滤得到浸提液。浸提液中的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 质量分数分别采用靛酚蓝比色法 [25] 和紫外分光光度法测定 [26]。

#### 1.3.2 土壤氨氧化细菌和氨氧化古菌 *amoA* 功能基因定量分析

##### 1) 土壤微生物总 DNA 提取

采用 Fast DNA SPIN Kit For Soil(MP Biomedicals, LLC)试剂盒和 Fast Prep 24 bead-beating instrument(Qbiogene, Inc.)细胞裂解仪提取土壤总 DNA。称取 0.5g 土壤样品(3 个重复), 按试剂盒操作说明提取土壤微生物总 DNA, 保存于 -20 °C 待测。用 Nano DropND-1000 UV-Vis 分光光度计测定所提 DNA 质量浓度, pH=3.8, 6.5 土样 DNA 质量浓度平均值分别为 27.36, 32.27 ng/μL。

##### 2) 氨氧化细菌和氨氧化古菌中的 *amoA* 基因实时荧光定量 PCR 分析

采用大连宝生物工程有限公司的 SYBR Premix Ex TaqTM Perfect Real Time 试剂盒与 CFX96 Real-Time PCR System 扩增仪分析。氨氧化细菌和古菌定量 PCR 分析的分子靶基因的引物序列及反应程序如表 2 所示。实时荧光定量 PCR 分析以土壤中提取的 DNA 为模板, 反应体系为 20 μL, 包括 1 μL DNA 模板、10 μL SYBR Premix Ex TaqTM Perfect Real Time, 前、后引物各 0.5 μL(10 μmol/L)及 8 μL 的灭菌

双蒸水. 实验对照用灭菌双蒸水代替 DNA 作为反应模板.

参照 He 等<sup>[27]</sup>报道的方法, 建立氨氧化细菌和古菌的标准曲线. 以土壤提取的 DNA 为模板进行氨氧化细菌和古菌 *amoA* 基因的 PCR 扩增, 扩增条件如表 2 所示. 将 PCR 产物中氨氧化细菌和古菌 *amoA* 基因 491bp 和 635bp 片段进行质粒重组并测序. 重组质粒测序结果分别与细菌(EU697770.1)和泉古菌(EU667887.1) *amoA* 基因比对, 选用同源性达 99% 的重组质粒作为标准 DNA. 质粒浓度采用 Nano DropND-1000 UV-Vis 分光光度计测定. 根据公式(1)分别计算氨氧化细菌和古菌 *amoA* 基因拷贝数, 即氨氧化微生物细胞数. 其中氨氧化细菌和古菌重组质粒浓度分别为  $5.46 \times 10^{10}$ ,  $8.21 \times 10^{10}$  cells/ $\mu\text{L}$ . 以 10 倍梯度分别稀释氨氧化细菌和古菌 *amoA* 基因重组质粒, 通过荧光实时定量 PCR 获得氨氧化细菌和古菌的标准曲线.

$$amoA \text{ 基因拷贝数} = \frac{\text{质粒浓度} \times V}{[(\text{载体片段长度} + \text{目的片段长度}) \times 2 \times \text{碱基平均分子量}] \times V} \times N_A \quad (1)$$

式中:  $V$  为单位体积; 载体片段长度为 2 736 bp; 每个碱基平均分子量为 324.5;  $N_A$  为阿伏伽德罗常数.

表 2 AOA 与 AOB 定量 PCR 引物序列及反应程序

基因名称	引物序列	片段长度/bp	定量 PCR 反应程序
AOB <i>amoA</i> 基因	<i>amoA</i> -1F GGGGTTTCTACTGGTGGT	491	95 °C, 2min; 40 * (95 °C, 45 s; 54 °C, 45 s; 72 °C, 45 s, ); Melt curve 95 °C, 15 s; 55 °C, 15 s; 95 °C, 15 s, increment 0.5 °C, 0 : 05+plate read
	<i>amoA</i> -2R CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC		
AOA <i>amoA</i> 基因	Arch- <i>amoA</i> FSTAATGGTCTGGCTTAGACG	635	95 °C, 30 s; 40 * (95 °C, 45 s; 54 °C, 45 s; 72 °C, 45 s, ); Melt curve 95 °C, 15 s; 55 °C, 15 s; 95 °C, 15 s, increment 0.5 °C, 0 : 05+plate read
	Arch- <i>amoA</i> R GCGGCCATCCATCTGTATGT		

## 1.4 数据分析

土壤中的硝化动力学过程可用一级或零级动力学方程拟合<sup>[23]</sup>. 表达式分别为:

$$N = N_0 + N_p(1 - \exp(-k_1 t)) \quad N = N_0 + k_0 t \quad (2)$$

式中:  $N$  为培养  $t$  天时  $\text{NO}_3^-$ -N 质量分数;  $t$  为培养天数;  $N_0$  为淋洗后  $\text{NO}_3^-$ -N 质量分数;  $N_p$  为潜在硝化强度;  $k_1$  和  $k_0$  分别表示一级和零级动力学过程的速率常数. 一级动力学潜在硝化速率  $V_p = k_1 * N_p$ <sup>[28]</sup>. 平均净硝化速率  $V_a = (N - N_0)/t$ .

数据处理及图表绘制采用 Sigmaplot 软件. 数据的显著性检验采用 SPSS 软件中的单因素方差分析 (ANOVA), 多重比较采用最小显著差数法 (LSD) 检验 ( $p < 0.05$ ).

## 2 结果与分析

### 2.1 不同 pH 紫色土的硝化动力学过程

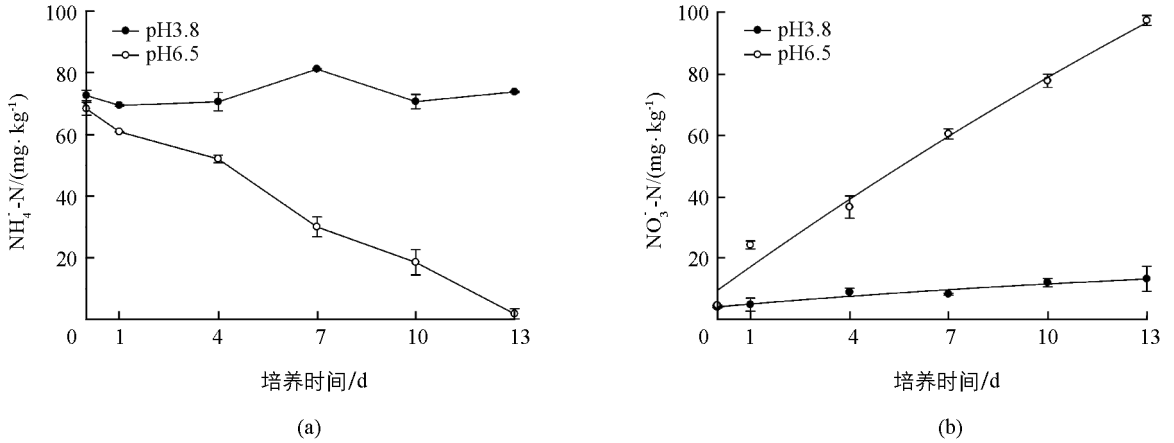
不同 pH 的酸性紫色土在培养过程中  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N 质量分数变化如图 1 所示. pH=6.5 土样  $\text{NH}_4^+$ -N 质量分数不断降低, 由 0 天的 69.1 mg/kg 下降到 13 天的 1.89 mg/kg; 而 pH=3.8 紫色土  $\text{NH}_4^+$ -N 质量分数差异性分析无统计学意义 ( $p > 0.05$ ). 培养过程中, pH=3.8, 6.5 土样  $\text{NO}_3^-$ -N 质量分数逐渐上升, 分别从 3.92, 4.55 mg/kg 上升到 11.2, 97.3 mg/kg. pH=6.5 土样中  $\text{NO}_3^-$ -N 增加量明显大于 pH=3.8 土样.

不同 pH 紫色土的硝化动力学拟合如图 1(b) 所示, 都符合一级动力学方程. 拟合参数如表 3 所示, pH=6.5 紫色土潜在硝化速率为 6.63 mg/(kg·d), 是 pH=3.8 紫色土 (0.63 mg/(kg·d)) 的 10 倍; pH=6.5 紫色土净硝化速率为 7.14 mg/(kg·d), 是 pH=3.8 紫色土 (0.56 mg/(kg·d)) 的 12.8 倍. pH=6.5 紫色土的潜在硝化速率和净硝化速率都明显高于 pH=3.8 的紫色土 ( $p < 0.05$ ).

表 3 硝化动力学拟合参数

pH	硝化动力学模式	$N_p /$ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	$k_1 /$ d	$V_p /$ [ $\text{mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ ]	$V_a /$ [ $\text{mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ ]	$R^2$
3.8	一级动力学模式	56.07	0.0112	0.628	0.56	0.968 *
6.5	一级动力学模式	159.1	0.0417	6.63	7.14	0.984 *

注: 1)  $N_p$  表示潜在硝化作用;  $k_1$  为速率常数; 潜在硝化速率  $V_p = k_1 * N_p$ ;  $V_a$  表示净硝化速率。2) \* 表示在 5% 水平上分析结果有统计学意义。

图 1 土壤中  $\text{NO}_3^- \text{-N}$ ,  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  质量分数随培养时间的变化

## 2.2 培养过程中紫色土 pH 变化

0 天时, 供试紫色土 pH 分别为 3.8, 6.5。如图 2 所示, 随着培养的进行土样 pH 都下降。第 0 天与 13 天 pH 相比较, pH=6.5 紫色土显著下降 ( $p < 0.05$ ), 而 pH=3.8 的紫色土差异分析无统计学意义 ( $p > 0.05$ )。这可能是由于 pH=6.5 紫色土进行了强烈硝化作用, 硝酸盐的大量积累导致 pH 值下降。

## 2.3 不同 pH 紫色土氨氧化细菌和氨氧化古菌丰度

紫色土中硝化微生物 AOB, AOA 的 *amoA* 基因拷贝数如图 3 所示。pH=6.5 的紫色土中 AOB, AOA 的 *amoA* 基因拷贝数分别为  $3.58 \times 10^7$ ,  $1.67 \times 10^8 / \text{g}$  干土, AOA 的 *amoA* 基因拷贝数是 AOB 的 4.7 倍; 而 pH=3.8 紫色土中 AOB, AOA 的 *amoA* 基因拷贝数分别为  $3.23 \times 10^6$ ,  $7.17 \times 10^6 / \text{g}$  干土, AOA 的 *amoA* 基因拷贝数是 AOB 的 2.2 倍。表现为同一 pH 紫色土中 AOA 的 *amoA* 基因拷贝数明显高于 AOB ( $p < 0.05$ )。不同 pH 紫色土中, pH 高的紫色土 AOB, AOA 的 *amoA* 基因拷贝数分别是 pH 低的紫色土的 11, 23 倍。pH=6.5 紫色土的 AOB, AOA 丰度都显著高于 pH=3.8 的紫色土 ( $p < 0.05$ )。

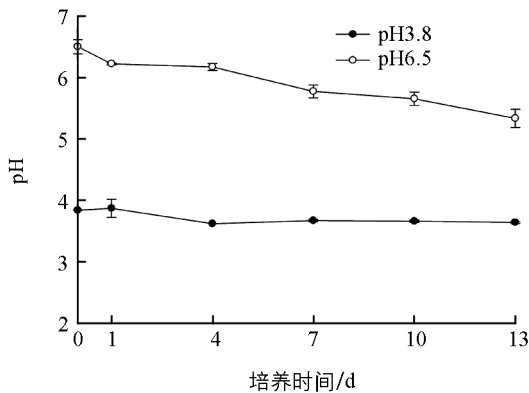


图 2 土壤 pH

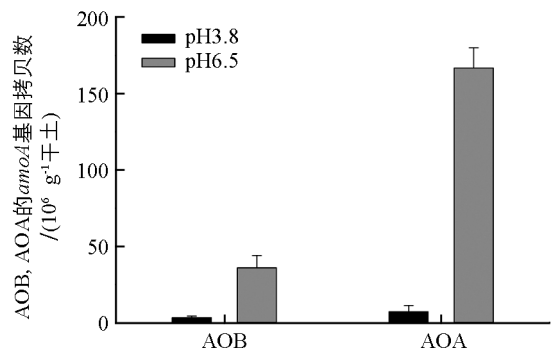


图 3 AOB, AOA 丰度

## 3 讨论

本实验结果表明: pH=6.5 的紫色土发生了强烈硝化作用, 而 pH=3.8 紫色土硝化作用微弱; 不同

pH 紫色土具有相同的硝化动力学模型, 均符合一级动力学方程。

硝化微生物参与的氨氧化过程是硝化反应的第一步, 也是限速步骤, 是全球氮循环的中心环节<sup>[29]</sup>。由于氨氧化过程的反应底物为非离子态氨(NH<sub>3</sub>)<sup>[3]</sup>, 因此影响 NH<sub>3</sub> 质量分数和硝化微生物的因素都将影响硝化过程。本实验氮源为 5 mmol/kg, 经计算 pH=3.8, 6.5 的紫色土 NH<sub>3</sub> 质量分数分别为  $2.46 \times 10^{-4}$ ,  $1.08 \times 10^{-1}$  mg/kg(NH<sub>3</sub> + H<sup>+</sup> ↔ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; pKa=9.25)。pH=6.5 紫色土 NH<sub>3</sub> 质量分数是 pH=3.8 紫色土的 439 倍。底物质量分数与硝化强度之间存在直接关系, pH 越高硝化越强。不同 pH 紫色土硝化动力学模型均符合一级动力学方程。一般认为当底物质量分数低于酶催化能力时, 硝化动力学模型符合一级动力学方程<sup>[23]</sup>。若硝化过程以一级动力学方程拟合, 则意味着反应速率受底物质量分数的影响。因此, 硝化底物(NH<sub>3</sub>)质量分数是影响本实验中硝化强弱的根本原因, 而非氨氧化微生物产生的氨单加氧酶活性不足。国内外大量研究也表明, pH 低的土壤硝化作用低<sup>[30-31]</sup>, 尤其是氨氧化作用明显降低<sup>[1]</sup>。因此本实验表明, pH 是通过影响硝化底物 NH<sub>3</sub> 质量分数而影响紫色土硝化作用, 且 pH 越低底物质量分数越低, 硝化作用越弱。

pH 影响土壤硝化作用的原因也可能是低 pH 限制了硝化微生物的生长<sup>[32]</sup>。氨氧化微生物含有编码催化氨氧化第一步反应的氨单加氧酶基因 *amoA*, *amoA* 基因在氨氧化菌中普遍存在且可作为氨氧化菌特异的分子标记<sup>[33]</sup>。实时荧光定量 PCR 技术测定的 AOB, AOA 的 *amoA* 基因拷贝数即反应了土壤 AOB, AOA 丰度。实验结果表明, pH=3.8, 6.5 紫色土中 AOA 丰度显著高于 AOB。陆地生态系统中氨氧化古菌的数量和分布均较氨氧化细菌更丰富<sup>[34]</sup>。尤其在低 pH 土壤中 AOA 可能具有很强的硝化活性<sup>[35]</sup>。近年来一些研究表明, 低 pH 土壤中氨氧化作用以 AOA 为主<sup>[35-37]</sup>。我们前期的研究也表明: 在酸性水稻土中 AOA 在硝化作用中占主导地位, 而石灰性水稻土中仍是 AOB 占主导地位<sup>[16]</sup>。本实验中, pH=3.8 的紫色土硝化微生物 AOB, AOA 丰度显著低于 pH=6.5 的紫色土, 低 pH 抑制了 AOB, AOA 的生长。但这是否是 pH 影响硝化速率的主要原因仍值得探讨。土壤中氨氧化微生物 AOB, AOA 中氨单加氧酶平均氨氧化速率约为 40 fmol/(cell · d)<sup>[16, 37]</sup>。由 AOB, AOA 丰度(假设一个 *amoA* 基因拷贝数代表一个细胞)计算可得, pH=3.8 紫色土的平均净硝化速率为 5.82 mg/(kg · d), pH=6.5 紫色土为 114 mg/(kg · d), 都远高于两种土壤的实际净硝化速率(0.56, 7.14 mg/(kg · d))。假定低 pH 土壤(pH=3.8)中氨氧化作用以 AOA 为主<sup>[16, 35-36]</sup>, 则可计算在本研究中, pH=3.8 紫色土的平均净硝化速率可以达到 4.02 mg/(kg · d), 远高于实际测定的净硝化速率。因此, 尽管低 pH 条件限制了硝化微生物的生长, 但硝化微生物 AOB, AOA 丰度的降低并非是限制硝化速率的主要原因。

## 4 结 论

强酸性紫色土(pH=3.8)硝化作用微弱, pH 对紫色土中硝化作用和硝化微生物具有显著影响, 主要通过影响 NH<sub>3</sub> 质量分数影响紫色土硝化速率。此外, 低 pH 抑制了紫色土硝化微生物 AOB, AOA 的生长, 但并非是低 pH 土壤硝化作用微弱的主要原因。

## 参考文献:

- [1] DE BOER W, KOWALCHUK G A. Nitrification in Acid Soils: Micro-Organisms and Mechanisms [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(7/8): 853-866.
- [2] 黄 波. 酸性土壤中的硝化作用研究进展 [J]. 防护林科技, 2015(3): 60-62, 69.
- [3] SUZUKI I, DULAR U, KWOK S C. Ammonia and Ammonium Ion as Substrate for Oxidation by *Nitrosomonas europaea* Cells and Extracts [J]. Journal of Bacteriology, 1974, 120(1): 556-558.
- [4] KOWALCHUK G A, STEPHEN J R. Ammonia-Oxidizing Bacteria: a Model for Molecular Microbial Ecology [J]. Annu Rev Microbiol, 2001(55): 485-529.
- [5] NOYES H A, CONNER S D. Nitrates, Nitrification, and Bacterial Contents of Five Typical Acid Soils as Affected by Lime, Fertilizer, Crops and Moisture [J]. Journal of Agricultural Research, 1919, 16(2): 27-60.
- [6] WEBER D F, GAINEY P L. Relative Sensitivity of Nitrifying Organisms to Hydrogen Ions in Soils and in Solutions [J].

Soil Science, 1962, 94(3): 138–145.

- [7] ROBERTSON G P. Factors Regulating Nitrification in Primary and Secondary Succession [J]. Ecology, 1982, 63(5): 1561–1573.
- [8] DAHLGREN R A. Soil Acidification and Nitrogen Saturation from Weathering of Ammonium-Bearing Rock [J]. Nature, 1994, 368(1): 838–841.
- [9] STARK J M, HART S C. High Rates of Nitrification and Nitrate Turnover in Undisturbed Coniferous Forests [J]. Nature, 1997, 385(6611): 61–64.
- [10] 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.
- [11] NUGROHO R A, ROLING W F M, STRAALEN N M V, et al. Changes in Nitrification and Bacterial Community Structure Upon Cross-Inoculation of Scots Pine Forest Soils with Different Initial Nitrification Rates [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(2): 243–250.
- [12] TOURNA M, FREITAG T E, NICOL G W, et al. Growth, Activity and Temperature Responses of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Soil Microcosms [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(5): 1357–1364.
- [13] OFFRE P, PROSSER J I, NICOL G W. Growth of Ammonia-Oxidizing Archaea in Soil Microcosms is Inhibited by Acetylene [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 70(1): 99–108.
- [14] JIA Z, CONRAD R. Bacteria Rather Than Archaea Dominate Microbial Ammonia Oxidation in an Agricultural Soil [J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(7): 1658–1671.
- [15] DI H J, CAMERON K C, SHEN J P, et al. Nitrification Driven by Bacteria and Not Archaea in Nitrogen-Rich Grassland Soils [J]. Nature Geoscience, 2009, 2(2): 621–624.
- [16] JIANG X J, HOU X Y, ZHON X, et al. pH Regulates Key Players of Nitrification in Paddy Soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015(81): 9–16.
- [17] 何毓蓉. 中国紫色土(下) [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [18] 李士杏, 王定勇. 重庆地区 20 年间紫色土酸化研究 [J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2005, 22(1): 70–73.
- [19] 张永春, 汪吉东, 沈明星, 等. 长期不同施肥对太湖地区典型土壤酸化的影响 [J]. 土壤学报, 2010, 47(3): 465–472.
- [20] 陈怀满. 环境土壤学 [M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [21] 杨剑虹, 胡王仲, 屈明, 等. 重庆农业土壤(中卷) [M]. 北京: 中国大地出版社, 2011.
- [22] STARK J M. Modeling the Temperature Response of Nitrification [J]. Biogeochemistry, 1996, 35(3): 433–445.
- [23] JIANG X J, LIU W, LIU Q, et al. Soil N Mineralization, Nitrification and Dynamic Changes in Abundance of Ammonia-Oxidizing Bacteria and Archaea Along a 2000 Year Chronosequence of Rice Cultivation [J]. Plant and Soil, 2013, 365(1): 59–68.
- [24] JIANG X J, SHI X L, LIU W, et al. Kinetics of Net Nitrification Associated with Soil Aggregates Under Conventional and No-Tillage in a Subtropical Rice Soil [J]. Plant and Soil, 2011, 347(1/2): 305–312.
- [25] 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.
- [26] 宋 歌, 孙波卡, 教剑英. 测定土壤硝态氮的紫外分光光度法与其他方法的比较 [J]. 土壤学报, 2007, 44(2): 288–293.
- [27] 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.
- [28] OORTS K, LAURENT F, MARY B, et al. Experimental and Simulated Soil Mineral N Dynamics for Long-Term Tillage Systems in Northern France [J]. Soil and Tillage Research, 2007, 94(2): 441–456.
- [29] PROSSER J I. Autotrophic Nitrification in Bacteria [J]. Advances in Microbial Physiology, 1989, 30(1): 125–181.
- [30] 蔡祖聪, 赵 维. 土地利用方式对湿润亚热带土壤硝化作用的影响 [J]. 土壤学报, 2009, 46(5): 795–801.
- [31] 范晓晖, 朱兆良. 我国几种农田土壤硝化势的研究 [J]. 土壤通报, 2002, 33(2): 124–125.
- [32] 朱兆良, 文启孝. 中国土壤氮素 [C]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1992.
- [33] 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.

- [34] LEININGER S, URICH T, SCHLOTTER M, et al. Archaea Predominate Among Ammonia-Oxidizing Prokaryotes in Soils [J]. *Nature*, 2006, 442(7104): 806–809.
- [35] STOPNISEK N, GUBRYRANGIN C, HÖFFERLE S, et al. Thaumarchaeal Ammonia Oxidation in an Acidic Forest Peat Soil is Not Influenced by Ammonium Amendment [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(22): 7626–7634.
- [36] HUANG R, WU Y C, ZHANG J B, et al. Nitrification Activity and Putative Ammonia-Oxidizing Archaea in Acidic Red Soils [J]. *J Soils Sediments*, 2012, 12(3): 420–428.
- [37] 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.

## Effects of pH on Nitrification and Nitrifying Microorganisms in Acid Purple Soil

SU Jing, WANG Zhi-hui, LI Shi-wei,  
XIE De-ti, JIANG Xian-jun

*School of Resource and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China*

**Abstract:** Nitrification, a typical biological process, is highly sensitive to pH. Purple soil samples with a pH value of 3.8 (the experimental group) and 6.5 (the control group) were collected from Yongchuan, Chongqing. Soil nitrification kinetics processes was studied by indoor incubation, and the abundance of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA) were determined by quantitative real-time PCR. The results showed that the net nitrification rate in purple soil with pH=6.5 was 7.14 mg/(kg·d) (calculated by N content for the article), being 12.8 times higher than that in the soil with pH=3.8 (0.56 mg/(kg·d)). The study also found that these two purple soils of different pH were with the same nitrification kinetics model- the first-order kinetics equation. Dynamic fitting parameters showed that the purple soil with a higher pH had a higher potential nitrification rate. The concentration of NH<sub>3</sub>, which is the substrate of the nitrification reaction, increased by order of magnitude with the increase of soil pH. The mass fraction of NH<sub>3</sub> in soil with pH=6.5 was  $1.08 \times 10^{-1}$  mg/kg, 439 times higher than that in soil with pH=3.8. The copy numbers of AOB and AOA amoA genes were  $3.23 \times 10^6$  and  $7.17 \times 10^6$ /g dry soil in the soil with pH=3.8, respectively, and  $3.58 \times 10^7$ ,  $1.67 \times 10^8$ /g dry soil in the purple soil with pH=6.5, respectively. The abundance of ammonia oxidizing microorganisms was significantly higher in purple soil with pH=6.5 than in soil with pH=3.8, but the quantity for ammonia oxidizing microorganisms in the soil with pH=3.8 still had considerably high nitrification potential. It is concluded from the above results that pH directly affects nitrification intensity in purple soil mainly by the change of the concentration of NH<sub>3</sub> the substrate of nitrification.

**Key words:** nitrification kinetics; real-time fluorescent quantitative PCR; ammonia monooxygenase gene

