

## 氮肥和多环芳烃对农田土壤细菌群落的影响

戴叶亮<sup>1,2,3</sup>, 朱清禾<sup>1</sup>, 曾军<sup>1</sup>, 郑金伟<sup>2</sup>, 吴宇澄<sup>1,3\*</sup>, 林先贵<sup>1</sup>

1. 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 江苏 南京 210008;

2. 南京农业大学资源环境与科学学院/农业资源与生态环境研究所, 江苏 南京 210095; 3. 湖泊与环境国家重点实验室, 江苏 南京 210008

**摘要:** 氮肥是农业生产的重要保障, 多环芳烃是广泛存在的环境污染物, 它们可能共存于农田土壤中, 对微生物群落产生影响。为探究施氮肥和多环芳烃污染叠加情况下的土壤微生物生态效应, 采集农田土壤, 设置添加尿素和苯并[a]蒽的组合处理, 建立微宇宙进行培养。在测定硝态氮积累、土壤 pH 以及污染物矿化的基础上, 结合定量 PCR、高通量测序等方法, 研究尿素和苯并[a]蒽对土壤细菌群落特征的影响。结果显示, 尿素导致土壤中硝态氮的积累, 显著增加了细菌氨单加氧酶基因 (*amoA*) 拷贝数, 但对古菌 *amoA* 基因丰度的影响不明显; 施用尿素导致土壤 pH 值降低, 显著影响 14 个主要土壤细菌门中的 10 个, 使得土壤细菌群落多样性显著下降, 整体结构发生极大变化; 相对于尿素而言, 苯并[a]蒽 84 d 的矿化率为 10%左右, 长期作用下具有改变土壤微生物群落组成和结构的潜力; 尿素对苯并[a]蒽的矿化未产生显著影响, 但苯并[a]蒽对土壤中氨氧化古菌有抑制作用, 抑制比例最高达 63%。这些结果表明, 尿素导致土壤中硝化微生物的富集, 并通过降低 pH 而对微生物群落产生深远的影响, 而苯并[a]蒽对土壤重要功能群和细菌总体群落有潜在的风险。该研究有助于阐明农田土壤中铵态氮肥和多环芳烃的复合生态效应, 为揭示有机污染物和氮转化间的交互作用机制提供了科学依据。

**关键词:** 多环芳烃; 尿素; 硝化; 细菌组成; 群落结构

**DOI:** 10.16258/j.cnki.1674-5906.2018.08.023

**中图分类号:** X53

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1674-5906 (2018) 08-1556-07

**引用格式:** 戴叶亮, 朱清禾, 曾军, 郑金伟, 吴宇澄, 林先贵. 2018. 氮肥和多环芳烃对农田土壤细菌群落的影响[J]. 生态环境学报, 27(8): 1556-1562.

DAI Yeliang, ZHU Qinghe, ZENG Jun, ZHENG Jinwei, WU Yucheng, LIN Xiangui. 2018. Effects of nitrogen fertilization and polycyclic aromatic hydrocarbon on bacterial community of farmland soil [J]. Ecology and Environmental Sciences, 27(8): 1556-1562.

自 20 世纪 70 年代以来, 中国氮肥用量不断增加(张卫峰等, 2013), 至 2011 年, 平均氮肥用量已达到  $180 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$  (以 N 计), 比世界平均水平高 75% (China Agricultural Yearbook Editing Committee, 2011)。在太湖流域稻田, 每年氮素综合使用量高达  $500 \sim 600 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$  (Zhao et al., 2012)。氮肥的过量施用产生了负面环境效应, 如温室气体排放 (Pearson et al., 1993; Krupa, 2003)、土壤酸化 (周细红等, 2004)、板结和水体富营养化等 (Bouwmeester et al., 1985), 同时也可能导致土壤微生物群落组成与功能的改变 (马冬云等, 2007)。氮肥可以直接刺激相关功能微生物的生长, 如氨氧化细菌 (AOB)、氨氧化古菌 (AOA)、亚硝酸氧化细菌 (Lisa et al., 2016) 等。此外, 过量施肥导致的土壤性质变化作用于土壤微生物整体群落结构, 会产生更为深远的生

态环境影响。

土壤污染是中国农业生产面临的另一重要威胁。多环芳烃 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 是一类具有“三致”毒性的稠合苯环结构有机物 (周丽虹, 2010), 主要来自于煤、石油等化石燃料以及一些生物质的不完全燃烧 (傅家谟等, 1996)。中国 PAHs 年排放量达 11.4 万吨 (Tao et al., 2009), 土壤中 PAHs 的点位超标率达到 1.4% (环境保护部等, 2014), 个别点位每千克土壤含 PAHs 可达数万微克 (Wu et al., 2016)。多环芳烃对土壤生态系统具有广泛的影响, 如引起动植物死亡与突变 (Staffan et al., 2007; Sverdrup et al., 2002), 抑制植物生长 (Maliszewska et al., 2000) 等, 并与微生物发生复杂的相互作用, 影响微生物的多样性、组成和生理功能 (Sawulski et al., 2014; Demenezes et al., 2012), 同时被微生物降解 (Fuchs

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (41671266); 湖泊与环境国家重点实验室开放基金项目 (2016SKL008); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2014CB441106)

**作者简介:** 戴叶亮 (1993 年生), 男, 硕士研究生, 主要从事有机污染物及微生物生态研究。E-mail: daiyl172839@163.com

\*通信作者: 吴宇澄 (1977 年生), 男, 副研究员, 博士。E-mail: ycwu@issas.ac.cn

**收稿日期:** 2018-01-24

et al., 2011; 吴宇澄等, 2013) 等。

受施肥和污染排放的影响, 一些农田土壤可能同时出现过量氮输入和 PAHs 污染。尽管有关其各自的微生物效应已有不少报道, 但对两者叠加情况下的土壤微生物群落响应仍缺乏研究。本研究分别选择尿素和苯并[a]蒽 (benz[a]anthracene, BaA) 为氮肥和 PAHs 的代表, 模拟土壤中过量施用尿素以及高浓度的 BaA 污染, 设置土壤微宇宙试验, 在测定尿素和苯并[a]蒽转化的基础上, 采用高通量测序和定量 PCR 方法深入解析添加污染物及施肥之后土壤细菌群落的丰度、多样性以及组成变化, 结果有助于阐明农田土壤中多环芳烃和铵态氮肥的复合效应, 并为探究有机污染物和氮转化间的交互作用机制提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

采样于 2016 年 4 月进行。供试土壤采自南京市郊某冶金企业附近的蔬菜地, 采用五点采样法采集土样后充分混匀为 1 个混合土样, 基本理化性质为: pH 6.5, 有机质 2.47%, 总氮  $1.39 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 铵态氮  $5.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 硝态氮  $6.4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 15 种优控 PAHs 总量  $922 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。土样经风干磨细后用于微宇宙培养试验。

### 1.2 微宇宙试验

微宇宙试验: 120 mL 血清瓶中装入 30 g 土壤 (干质量), 调节土壤含水量为田间持水量的 60%, 于黑暗的环境中 ( $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 培养。共设置 4 个处理: 对照处理 (CK)、只添加苯并[a]蒽 (A)、只添加尿素 (N)、添加苯并[a]蒽和尿素 (NA)。苯并[a]蒽和尿素的最终质量分数分别为  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  和  $56 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 在培养的第 28 天和第 56 天补充等 N 量的尿素。每个处理设置 9 个重复, 在培养的第 28 天、第 56 天以及第 84 天进行破坏性取样 (每个处理每次各 3 个)。土壤经处理后, 一部分用于 pH 及无机氮测定, 一部分提取 DNA 后用于下游分子生态分析。

同时设置一组平行土壤微宇宙试验, 通过测定 [7,12- $^{14}\text{C}$ ] 苯并[a]蒽 (American Radiolabeled Chemicals, Inc.) 的矿化量表征污染物的转化率。设置 2 个处理: 只添加苯并[a]蒽 (A), 同时添加尿素和苯并[a]蒽 (NA), 其中苯并[a]蒽为  $^{14}\text{C}$  和未标记的苯并[a]蒽混合物, 土壤中污染物和尿素的终浓度及含水量同上所述, [7,12- $^{14}\text{C}$ ] 苯并[a]蒽添加量为  $2.2\times 10^5 \text{ dpi}\cdot\text{g}^{-1}$ , 每个处理设置 3 个平行。

### 1.3 土壤 pH 和硝态氮的测定

采用酸度计测定土壤 pH (水土比 5:1); 用  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl 溶液提取土壤无机氮, 用  $\text{VCl}_3$  将硝态氮

还原为亚硝态氮后, 采用 Griess 试剂法测定 (Wu et al., 2013)。

### 1.4 多环芳烃矿化量测定

以  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 溶液吸收  $\text{CO}_2$ , 采用液体闪烁计数法 (Beckman-Coulter, USA) (Wang et al., 2017) 测定  $^{14}\text{CO}_2$  量。每两周取样测试 1 次。

### 1.5 土壤 DNA 提取

采用 FastDNA SPIN Kit for Soil 试剂盒 (MP Biomedicals) 提取土壤 DNA, 微量分光光度计 (NanoDrop 2000) 和电泳法检测 DNA 的质量。为避免共提取的土壤腐殖质等杂质干扰 PCR 反应, DNA 提取液经 10 倍稀释后用于下游分析。

### 1.6 硝化微生物功能基因定量 PCR 分析

参照文献方法 (Cebren et al., 2008), 采用定量 PCR 方法测定各样品细菌和古菌单加氧酶基因 (*amoA*) 的拷贝数。定量 PCR 标准品的制备方法为: 克隆目标基因提取质粒后测定其浓度并计算拷贝数, 进行梯度稀释后绘制标准曲线 (拷贝数范围  $10^2\sim 10^8 \mu\text{L}^{-1}$ ), 定量 PCR 曲线标准  $R^2>0.99$ , 扩增效率  $\geq 80\%$ 。

定量 PCR 采用 Sybr Green 方法。总反应体积为  $20 \mu\text{L}$ , 包含  $10 \mu\text{L}$  TransStart Green qPCR SuperMix (全式金),  $2 \mu\text{L}$  土壤 DNA 和  $8 \text{ pmol}$  引物。古菌 *amoA* 基因 (引物序列:  $5'\text{-ATG GTC TGG YTW AGA CG -3'}$  和  $5'\text{-GCC ATC CAB CKR TAN GTC CA-3'}$ ) 反应程序为:  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min,  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  45 s,  $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s 并读取荧光信号, 38 个循环; 细菌 *amoA* 基因 (引物序列:  $5'\text{-GGG GTT TCT ACT GGT GGT-3'}$  和  $5'\text{-CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC-3'}$ ) 反应程序为:  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min,  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  45 s,  $53 \text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,  $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s 并读取荧光信号, 36 个循环。随后进行熔解曲线分析, 采用电泳分析评价其扩增单一性。

### 1.7 细菌 16S rRNA 基因高通量测序及数据分析

采用通用引物 519F 和 907R (引物序列:  $5'\text{-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'}$  /  $5'\text{-TTACGACTT-3'}$ ) 扩增细菌 16S rRNA 基因片段, 其中正向引物序列中包含 5 bp 的条形码 (barcode) 序列。PCR 反应体积为  $50 \mu\text{L}$ , 包括  $25 \mu\text{L}$  Taq DNA 聚合酶预混液 (Takara),  $1 \mu\text{L}$  模板 (约  $50 \text{ ng}$  基因组 DNA),  $1 \mu\text{L}$  正向及反向引物,  $23 \mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。PCR 扩增条件为  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  3 min,  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  45 s,  $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$  45 s,  $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$  60 s, 35 个循环。PCR 产物经纯化后构建测序文库, 采用 Illumina MiSeq 系统进行双向高通量测序 (上海美吉)。

### 1.8 数据分析

基于 QIIME 分析平台进行高通量数据分析。序

列经拼接、比对后在 97%相似性水平划分操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU), 以此为基础计算多样性指数和非度量多维尺度分析 (Nonmetric Multidimensional Scaling, NMDS)。运用 R 软件 (vegan 数据包) 计算细菌群落之间的布雷距离 (Bray distance), 采用 SPSS 19.0 对数据进行单因素方差分析 (ANOVA) 和多重比较, 用 Graphpad Prism 5 作图。图表中数据均为平均值 $\pm$ 标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤硝化和污染物矿化

随着培养的进行, 4 个处理微宇宙试验都出现明显的  $\text{NO}_3^-$ -N 积累 (图 1A)。两个添加尿素的处理 (N 和 NA) 硝态氮上升幅度更大, pH 降低约 1 个单位, 提示土壤硝化导致土壤酸化 (图 1B)。在 84 d 时, NA 处理相对于 N 处理硝态氮增加缓慢, 同时加入 BaA (A 和 NA) 处理相对于不加的处理 (CK 和 N) 土壤 pH 下降幅度有所减小。

培养过程中,  $^{14}\text{CO}_2$  持续积累, 84 d 矿化量约为 10% (图 1C)。添加尿素与否对土壤中 BaA 的矿化没有显著影响。

### 2.2 硝化微生物功能基因丰度

定量 PCR 检测中, 硝化微生物功能基因扩增产

物经溶解曲线分析和电泳分析为单一峰 (条带), 表明扩增不受引物二聚体或者非特异扩增影响。所有处理中, 细菌 *amoA* 基因拷贝数为  $1.2 \times 10^7 \sim 5.6 \times 10^7$  copies $\cdot$ g $^{-1}$ , 古菌 *amoA* 基因拷贝数为  $3.0 \times 10^6 \sim 1.3 \times 10^7$  copies $\cdot$ g $^{-1}$ 。

不添加尿素的 CK 和 A 处理中, 细菌 *amoA* 基因拷贝数无显著变化, N 处理在 28 d 时显著升高而后呈现逐渐下降趋势, NA 处理在 28 d 和 56 d 持续升高, 但在 84 d 大幅度下降 (图 2A)。在 N 和 CK 处理中, 古菌 *amoA* 基因拷贝数未发生显著变化; 但添加 BaA 后, 虽然 NA 处理中 AOA 数量在 28 d 有所增加, 但是到 56 d 和 84 d 后, NA 和 A 处理中古菌 *amoA* 基因拷贝数显著降低, 其中 84 d NA 处理中 AOA 的数量相比于 CK, 降低了 63%。(图 2B)。

### 2.3 土壤细菌多样性变化

Miseq 测序中, 38 个样品一共获得 962 536 条 16S rRNA 基因序列, 单个样品的序列数为 17 795~38 255, 在 97%序列相似性水平获得 5 236 个 OTU。每个样品随机抽样 17 700 条做 OTU 表, 在此基础上分析土壤细菌的群落组成与多样性。

与原始土壤相比较, 84 d 的培养导致 CK 处理中细菌多样性明显降低, BaA 的加入则未对土壤微生物多样性指数产生影响。添加尿素的处理中, 土

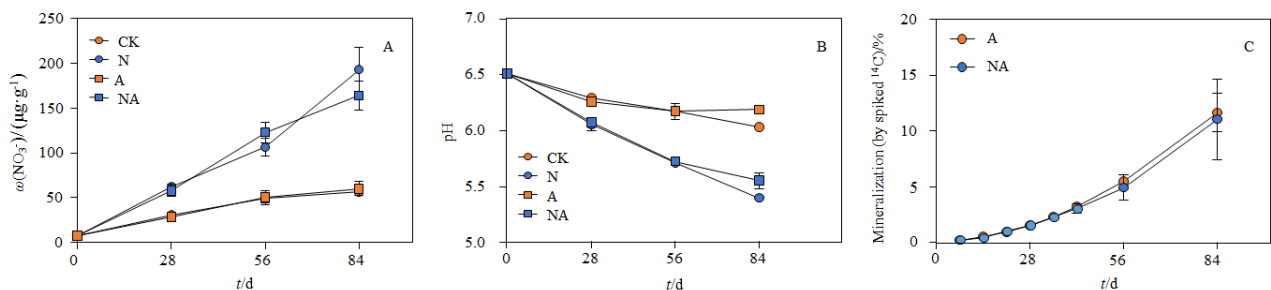


图 1 微宇宙培养过程中土壤  $\text{NO}_3^-$  含量 (A)、pH (B) 以及苯并[a]蒽矿化率 (C) 的变化  
Fig. 1 Changes in  $\text{NO}_3^-$  (A), soil pH (B) and mineralization of benz[a]anthracene (C) during the incubation

$n=3$

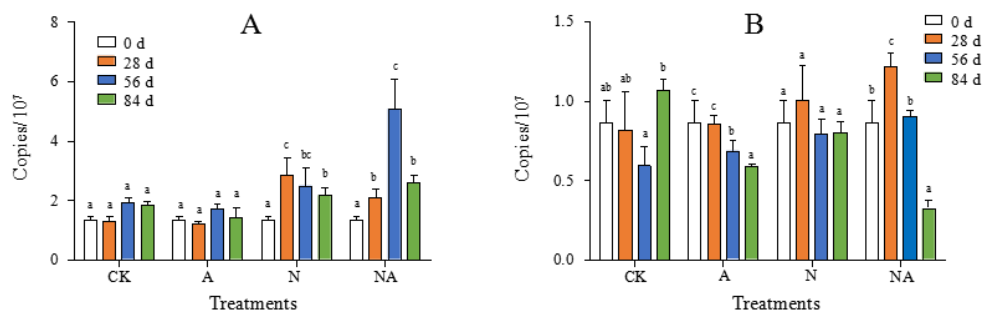


图 2 培养过程中细菌 (A) 和古菌 *amoA* 基因 (B) 丰度的变化  
Fig. 2 Changes in the bacterial (A) and archaeal *amoA* gene copies (B) during the incubation

$n=3$ ; 不同小写字母表示相同处理之间有显著性差异 ( $P<0.05$ )

$n=3$ ; There is a significant difference between different treatment ( $P<0.05$ )

壤细菌群落多样性显著下降,在培养 84 d 时下降趋势尤为明显,Chao1 指数、观测到的物种数和香农指数等均显著降低(图 3)。

### 2.4 土壤细菌群落结构变化

随着培养的进行,土壤中细菌群落结构发生变化。NMDS 分析(图 4A)显示:28 d 时,各处理土壤细菌群落相对聚集,未有明显区分;56 d 起,添加尿素处理与不添加尿素处理形成了不同的细菌群落结构,N 和 NA 处理与 A 和 CK 处理群落之间差异明显,但 BaA 对群落结构的影响相对较小;84 d 时,细菌群落间的差异进一步增大。统计分析显示(图 4B),培养 28 d 时,A、N 及 NA 3 个处理与 CK 之间未有显著变化,到 56 d 加尿素处理中细菌群落结构已经与 CK 显著不同,而 84 d 时,各处理中细菌群落都有极显著变化且尿素的影响大于 BaA。

在纲(Class)分类水平,土壤中相对丰度≥1%的主要细菌门类有 14 个(表 1)。在此 14 个纲中,6 个纲的相对丰度和土壤 pH 呈正相关关系,其中 2

表 1 纲水平土壤细菌相对丰度和 pH 之间相关性分析  
Table 1 Correlation between dominant bacterial class and soil pH

纲 Class	r	P
Acidobacteria Gp3	-0.584	0**
Acidobacteria Gp4	0.244	0.140
Acidobacteria Gp6	0.336	0.039*
Acidobacteria Gp7	0.779	0**
Actinobacteria	0.708	0**
Sphingobacteriia	-0.433	0.007**
Bacilli	0.623	0**
Gemmatimonadetes	-0.521	0.001**
Planctomycetia	-0.022	0.896
Alphaproteobacteria	0.355	0.029*
Betaproteobacteria	-0.802	0**
Deltaproteobacteria	0.196	0.239
Gammaproteobacteria	0.740	0**
WPS-1	0.310	0.058

\*表示处理之间距离和系统误差之间有显著性差异,即  $P<0.05$ , \*\*表示处理之间距离和系统误差之间有极显著差异,即  $P<0.01$

\* means there is a significant difference between the distance of the treatments,  $P<0.05$ , \*\* means there is a highly significant difference between the distance of treatments,  $P<0.01$

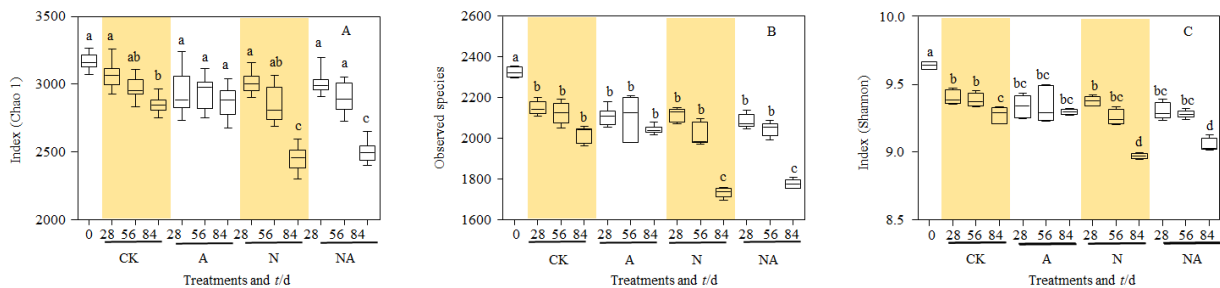


图 3 培养过程中土壤多样性指数变化: Chao1 指数 (A)、观测到的物种数 (B)、香农指数 (C)

Fig. 3 Change of soil diversity index: Chao 1 (A), Observed species (B), Shannon (C)

$n=9$ ; 不同小写字母表示相同处理之间有显著性差异 ( $P<0.05$ )

$n=9$ ; There is a significant difference between different treatment ( $P<0.05$ )

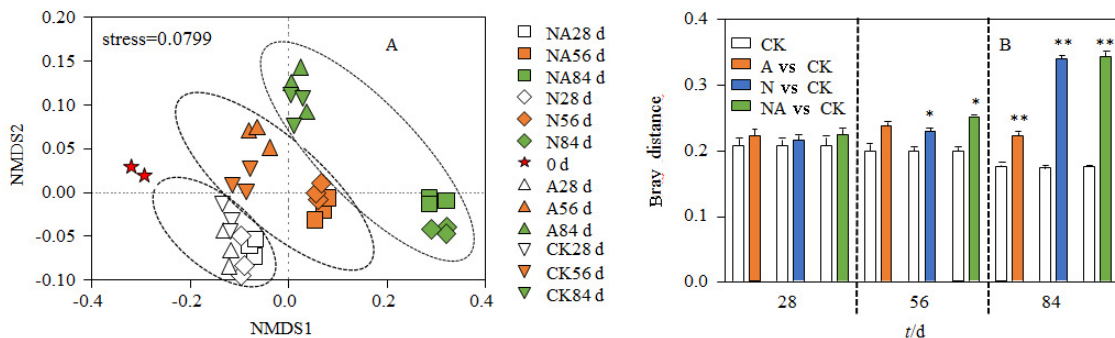


图 4 土壤细菌群落间的 NMDS (A) 和布雷距离分析 (B)

Fig. 4 NMDS (A) and bray\_distance (B) analysis of soil bacteria communities

$n=3$ ; 以 CK 处理内的群落布雷距离 (bray\_distance) 为基准, A vs CK 表示 A 和 CK 处理间群落布雷距离,以此类推。\*表示处理之间距离和系统误差之间有显著性差异,即  $P<0.05$ , \*\*表示处理之间距离和系统误差之间有极显著差异,即  $P<0.01$

$n=3$ ; Use bray\_distance of CK to be a benchmark, A vs CK means bray\_distance between treatment A and CK and so on N vs CK, NA vs CK. \* means there is a significant difference between the distance of the treatments,  $P<0.05$ , \*\* means there is a highly significant difference between the distance of treatments,  $P<0.01$

个为显著相关, 4个为极显著相关; 4个纲和土壤pH均呈极显著负相关关系。此外, 添加尿素显著增加了和土壤亚硝酸氧化相关的 *Nitrospirae* 的丰度(数据未显示)。这些结果表明, 尿素很可能促进了相关的硝化微生物生长, 但是土壤中细菌群落整体变化可能主要由尿素导致的pH变化引起。

### 3 讨论

#### 3.1 尿素的微生物生态效应

大量研究发现, 使用铵态氮肥会出现明显的硝酸盐积累同时显著降低土壤pH(Phillip et al., 1997; Bouman et al., 1995; Dlana et al., 2008)。本研究中, 添加尿素处理中出现的此类现象, 究其原因为底物刺激导致的土壤硝化活性增加。硝化过程由氨氧化和亚硝酸氧化两个步骤组成, 其中氨氧化过程主要由氨氧化细菌和氨氧化古菌完成(Lisa et al., 2016), 它们受到土壤pH值的强烈影响(He et al., 2012)。由于供试土壤为中性, 氨分子浓度较高, 有利于氨氧化细菌的生长, 反映为相应微宇宙中细菌 *amoA* 基因拷贝数的增加; 在此环境下, 氨氧化古菌可能居于竞争劣势(Zhang et al., 2012), 而未出现明显增殖。

土壤pH直接影响着微生物的多样性和组成结构(Wu et al., 2016; Kateryna et al., 2015; Lauber et al., 2009)。在本研究中, 随着培养的进行, 尤其是56d之后, 添加尿素微宇宙土壤的pH明显降低, 对土壤微生物群落产生了巨大的影响。一方面, 这可能导致了培养后期硝化微生物丰度的降低(图2), 另一方面改变了土壤中的优势微生物(表1)、降低了土壤微生物的多样性(图3), 并进一步导致细菌群落整体变化(图4)。土壤酸化不仅影响微生物, 还会导致土壤有毒重金属离子活性增加、土壤肥力降低、结构变差以及影响作物生长发育等一系列问题(Sutradhar et al., 2014; Baquy et al., 2017; Lofton et al., 2010)。本研究所模拟的施氮量与目前太湖流域部分稻田的综合施肥量相近(Zhao et al., 2012), 因此, 过量施用氮肥导致的土壤生态风险不可忽视。

#### 3.2 苯并[a]蒽的微生物生态效应

有研究发现, 高浓度的多环芳烃污染能显著改变土壤微生物的多样性(吴宇澄等, 2016)、群落组成和生理活性(Sawulski et al., 2014; Demenezes et al., 2012)。对本研究采样区的原位调查结果显示(Wu et al., 2016; Wu et al., 2017), 与PAHs污染相比, pH是更重要的土壤微生物群落结构决定因素。本研究通过微宇宙培养所获得的结果与原位调查相似, 初始质量分数为  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的BaA对土壤微生物多样性和微生物群落结构的影响相

对较小。分析其原因, 可能是由于BaA的矿化率只有10%左右(图1C), 更多的污染物还是以各种形态存在于土壤中, 而BaA是一种疏水性污染物, 与土壤基质发生结合后, 生物有效性降低。但是, 长期PAHs作用的微生物群落效应依然存在。本研究中, 84d时CK与A处理下的细菌群落产生了较明显的分离(图4)。虽然目前这种改变的机制尚不清楚, 但有文献报道, PAHs对微生物具有选择性(吴宇澄等, 2016), 导致降解功能细菌的富集与敏感细菌的下降(Cebon et al., 2008; Chen et al., 2015; Bengtsson et al., 2013); 此外, 许多PAHs降解的中间产物可能具有更高的生物毒性(Staffan et al., 2007), 如我们发现BaA的降解中间产物苯并[a]蒽醌对一类氨氧化古菌有更强的抑制效果(Dai et al., 2018), 这些中间产物也会形成一定的生态风险。考虑到PAHs类污染物种类的多样与土壤的复杂性, 需进一步探究PAHs的土壤微生物生态效应。

#### 3.3 尿素和苯并[a]蒽对土壤微生物的交互作用

尿素和苯并[a]蒽的转化均是微生物作用的结果。土壤中氮循环和污染物降解过程是否存在相互作用, 是污染生态学和污染土壤修复研究关注的重要科学问题。 $\text{CO}_2$ 是PAHs转化的最终形态, 是污染土壤修复的最理想状态, 矿化率是土壤中PAHs修复效果的重要指标。一般而言, PAHs矿化率越高, 表明解毒效果越好。本研究中, 添加尿素未对BaA的矿化率产生显著影响。分析其原因, 可能是由于供试土壤本身的理化性质、结构特征导致尿素或者硝化过程对BaA的矿化影响本身就较小(Kästner et al., 1998)。但有研究发现, 弱酸能够显著促进土壤中PAHs的矿化(Bhabananda et al., 2017), 硝化微生物(AOA)具有降解芳香性污染物的能力(Men et al., 2016)。在不同的土壤中, 由于受微生物群落、土壤化学性质、物理结构以及尿素和PAHs的浓度等因素影响, 尿素是否影响PAHs的矿化还有待更深入的研究。

此外, 供试土壤有较长的PAHs污染历史(Wu et al., 2016), 这可能导致土壤硝化微生物产生抗性从而产生适应性(Griffiths et al., 2013), 故添加BaA后, 本研究未像其他研究(Cheng et al., 2014)一样出现土壤硝化活性的显著降低。但是,  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的BaA显著降低了土壤中古菌 *amoA* 基因拷贝数, 并减缓了土壤硝化过程伴随的土壤酸化。由此推测, BaA可能对土壤中尿素的硝化产生影响, 这与我们此前观察到PAHs对氨氧化古菌的抑制效应一致。

### 4 结论

本研究探究了尿素和苯并[a]蒽对农田土壤微

生物群落的生态效应。结果显示, 尿素显著刺激土壤硝化活性和硝化细菌生长, 降低土壤 pH, 并通过土壤酸化对微生物群落产生极大影响; 苯并[a]蒽有抑制土壤硝化、改变土壤微生物组成和结构的潜在趋势, 但作用相对较小; 受试土壤中, 尿素虽未抑制苯并[a]蒽的矿化, 但苯并[a]蒽抑制了土壤中硝化古菌的生长, 且减缓了硝化过程伴随的土壤 pH 降低。鉴于土壤间存在的理化性质和微生物群落差异, 还需更深入地研究施肥和有机污染物的土壤生态效应及其相互作用。

**致谢:** 感谢南京大学季荣教授对于本研究中多环芳烃矿化分析的大力支持!

### 参考文献:

- BAQUY M A, LI J Y, XU C Y, et al. 2017. Determination of critical pH and Al concentration of acidic Ultisols for wheat and canola crops [J]. *Solid Earth*, 8: 149-159.
- BENGTSSON G, TÖRNEMAN N, DE LIPTHAY J R, et al. 2013. Microbial diversity and PAH catabolic genes tracking spatial heterogeneity of PAH concentrations [J]. *Microbial Ecology*, 65(1): 91-100.
- BHABANANDA B, BINOY S, RUHAIDA R, et al. 2017. Mild acid and alkali treated clay minerals enhance bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in long-term contaminated soil: A <sup>14</sup>C-tracer study [J]. *Environmental Pollution*, 223: 255-265.
- BOUWMEESTER R J B, VLEK P L G, STUMPE J M. 1985. Effect of environmental factors on ammonia volatilization from a urea fertilized soil [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 49(2): 376-381.
- CEBRON A, NORINI M P, BEGUIRISTAIN T, et al. 2008. Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from gram positive and gram negative bacteria in soil and sediment samples [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 73(2): 148-159.
- CHEN S C, PENG J J, DUAN G L. 2015. Enrichment of functional microbes and genes during pyrene degradation in two different soils [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 16(2): 417-426.
- CHENG J J, SONG J, DING C F, et al. 2014. Ecotoxicity of benzo[a]pyrene assessed by soil microbial indicators [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(9): 1930-1936.
- China Agricultural Yearbook Editing Committee. 2011. *China agricultural yearbook* [M]. Beijing: China Agriculture Press.
- DAI Y L, WU Y C, DING Q M, et al. 2018. Oxygenated derivative is more influential than unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbon on ammonia-oxidizing archaea in an acidic soil [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 18(7): 2573-2580.
- DEMENEZES A, CLIPSON N, DOYLE E. 2012. Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil [J]. *Environmental Microbiology*, 14(9): 2577-2588.
- DLANA R N, ALAN R T, SARAH R S, et al. 2008. The effects of chronic nitrogen fertilization on alpine tundra soil microbial communities: implications for carbon and nitrogen cycling [J]. *Environmental Microbiology*, 10(11): 3093-3105.
- FUCHS G, BOLL M, HEIDER J. 2011. Microbial degradation of aromatic compounds from one strategy to four [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 9(11): 803-816.
- GRIFFITHS B S, PHILIPPOT L. 2013. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2): 112-129.
- HE J Z, HU H W, ZHANG L M. 2012. Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 55: 146-154.
- KÄSTNER M, BREUERJAMMALI M, MAHRO B. 1998. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil [J]. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, 64(1): 359-362.
- KATERYNA Z, RAQUEL D, PATRICIA D D Q. 2015. Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment [J]. *Microbial Ecology*, 69(2): 395-406.
- KRUPA S V. 2003. Effects of atmospheric ammonia (NH<sub>3</sub>) on terrestrial vegetation: a review [J]. *Environmental Pollution*, 124(2): 179-221.
- LAUBER C L, HAMADY M, KNIGHT R, et al. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15): 5111-5120.
- LISA Y S, MARTUIN G K. 2016. The nitrogen cycle [J]. *Cell, Current Biology*, 26(3): 93-98.
- LOFTON J, GODSEY C B, ZHANG H. 2010. Determining aluminum tolerance and critical soil pH for winter canola production for acidic soils in temperate regions [J]. *Agronomy Journal*, 102(1): 327-332.
- MALISZEWSKA K B, SMRE CZAK B. 2000. Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-effect on plants [J]. *Environmental Technology*, 21(10): 1099-1110.
- BOUMAN O T, CURTIN D, CAMPBELL C A, et al. 1995. Soil acidification from long-term use of anhydrous ammonia and urea [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 59(5): 1488-1494.
- PEARSON J, STEWATT G R. 1993. The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants [J]. *New Phytologist*, 125(2): 283-305.
- PHILLIP B, BABOU O J, ARMAND R K, et al. 1997. Effects of long-term soil acidification due to nitrogen fertilizer inputs in Wisconsin [J]. *Plant and Soil*, 197(1): 61-69.
- SAWULSKI P, CLIPSON N, DOYLE E. 2014. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on microbial community structure and PAH ring hydroxylating dioxygenase gene abundance in soil [J]. *Biodegradation*, 25(6): 835-847.
- STAFFAN L, PAUL A W, CHRISTINE L. L, et al. 2007. Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated site [J]. *Ambio: A Journal of the Human Environment*, 36(6): 475-485.
- SUTRADHAR A, LOLLATO R P, BUTCHEE K, et al. 2014. Determining critical soil pH for sunflower production [J]. *International Journal of Agronomy*, 2014: 1-13.
- SVERDRUP L E, NIELSEN T, KROGH P H. 2002. Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility [J]. *Environmental Science and Technology*, 36(11): 2429-2435.
- WANG Y F, XU J, JI R. 2017. Fate of phenanthrene and mineralization of its non-extractable residues in an oxic soil [J]. *Environmental Pollution*, 224: 377-383.
- WU Y C, ZENG J, ZHU Q H, et al. 2017. pH is the primary determinant of the bacterial community structure in agricultural soils impacted by

- polycyclic aromatic hydrocarbon pollution [J]. Scientific Reports, DOI: 10.1038/srep40093.
- WU Y C, ZHU Q H, ZENG J, et al. 2016. Effects of pH and polycyclic aromatic hydrocarbon pollution on thaumarchaeotal community in agricultural soils [J]. Journal of Soils and Sediments, 16(7): 1960-1969.
- WU Y C, KE X B, WANG B Z, et al. 2013. Autotrophic growth of bacterial and archaeal ammonia oxidizers in freshwater sediment microcosms incubated at different temperatures [J]. Applied Environmental Microbiology, 79(9): 3076-3084.
- MEN Y J, HAN P, DAMIAN E. et al. 2016. Biotransformation of two pharmaceuticals by the ammonia-oxidizing archaeon nitrososphaera gargensis [J]. Environmental Science and Technology, 50(9): 4682-4692.
- TAO Y Q, ZHANG S Z, ZHU Y G. 2009. Uptake and acropetal translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in field-contaminated soil [J]. Environmental Science and Technology, 43(10): 3556-3560.
- ZHANG L M, SHEN J P, HE J Z, et al. 2012. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils [J]. Isme Journal Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 6(5): 1032-1045.
- ZHAO X, ZHOU Y, MIN J, et al. 2012. Nitrogen runoff dominates water nitrogen pollution from rice-wheat rotation in the Taihu Lake region of China [J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 156(4): 1-11.
- 傅家谟, 盛国英. 1996. 环境有机地球化学初探[J]. 地学前缘, 3(2): 127-132.
- 环境保护部, 国土资源部. 2014. 全国土壤污染状况调查公报[J]. 中国环保产业, (5): 5-10
- 马冬云, 郭天财, 宋晓, 等. 2007. 尿素施用量对小麦根际土壤微生物数量及土壤酶活性的影响[J]. 生态学报, 27(12): 5222-5228.
- 吴宇澄, 林先贵, 朱清禾. 2016. 冶炼企业周边农田土壤的多环芳烃污染及其细菌群落效应[J]. 生态毒理学报, 11(2): 484-491.
- 吴宇澄, 林先贵. 2013. 多环芳烃污染真菌修复进展[J]. 土壤学报, 50(6): 125-132.
- 张卫峰, 马林, 黄高强, 等. 2013. 中国氮肥发展、贡献和挑战[J]. 中国农业科学, 46(15): 3161-3171.
- 周丽虹. 2010. 多环芳烃的污染来源及防治措施[J]. 农村经济与科技, 21(4): 126.
- 周细红, 曾清如, 蒋朝辉, 等. 2004. 尿素施用对土壤 pH 值和模拟温室箱内 NH<sub>3</sub> 和 NO<sub>2</sub> 浓度的影响[J]. 土壤通报, 35(3): 374-376.

## Effects of Nitrogen Fertilization and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon on Bacterial Community of Farmland Soil

DAI Yeliang<sup>1,2,3</sup>, ZHU Qinghe<sup>1</sup>, ZENG Jun<sup>1</sup>, ZHENG Jinwei<sup>2</sup>, WU Yucheng<sup>1,3\*</sup>, LIN Xiangui<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China;

2. Institute of Resources, Ecosystem and Environment for Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

3. State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

**Abstract:** Nitrogen fertilizer is important for agricultural production while polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are widespread environmental pollutants, which may coexist in farmland and impact soil microbial communities. In order to explore microbial ecological effects of nitrogen fertilizer and polycyclic aromatic hydrocarbons pollution in farmland soil, we set up soil microcosm experiments with combined treatments of urea and benz[a]anthracene. Nitrate accumulation, soil pH and pollutant mineralization were determined during the incubation period. Additionally, quantitative PCR and high-throughput sequencing was carried out to reveal the changes in soil bacterial community. It was found that urea increased the number of bacterial *amoA* gene copies but had minimal influence on archaeal *amoA* gene copies, indicating that urea stimulated growth of nitrifiers in soil and greatly affected the diversity of soil bacterial community and the whole structure by the decrease of pH; The mineralization of benz[a]anthracene was only 10% at the end of incubation, suggesting a long-term effects of the pollutant on soil bacterial community composition, as evidenced by the inhibition of ammonia oxidizing archaea in benz[a]anthracene spiked soil microcosms. Besides, the impact of benz[a]anthracene mineralization by urea was negligible. All of these results indicate that urea leads to enrichment of nitrifying microorganisms in soil and has a profound impact on microbial community by reducing pH. Benz[a]anthracene has potential risks to important functional groups and bacterial communities. Our study is helpful to elucidate the multiple ecological effects of ammonium nitrogen and polycyclic aromatic hydrocarbons in farmland soil, and provide scientific support for revealing the interaction between organic pollutants and nitrogen transformation.

**Key words:** polycyclic aromatic hydrocarbons; urea; nitrification; bacterial composition; community structure