

研究报告

短期培养下硝化抑制剂对黑土氨氧化微生物丰度和硝化作用的影响

常钰海¹, 沈菊培^{*1}, 巫汶晶¹, 马星竹², 郝小雨², 赵月², 贺纪正¹

1 福建师范大学 湿润亚热带生态-地理过程教育部重点实验室, 福建 福州 350007

2 黑龙江省黑土保护利用研究院, 黑龙江 哈尔滨 150086

常钰海, 沈菊培, 巫汶晶, 马星竹, 郝小雨, 赵月, 贺纪正. 短期培养下硝化抑制剂对黑土氨氧化微生物丰度和硝化作用的影响[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 5037-5050.

CHANG Yuhai, SHEN Jupei, WU Wenjing, MA Xingzhu, HAO Xiaoyu, ZHAO Yue, HE Jizheng. Nitrification inhibitors affect the abundance of ammonia-oxidizing microorganisms and nitrification in black soil in a short-term microcosm[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 5037-5050.

摘要:【背景】东北黑土区是我国重要的粮食生产基地, 然而由于化肥的过量使用, 已造成土壤氮素的大量损失和环境污染问题。硝化作用是土壤氮循环的核心环节, 主要由微生物驱动。【目的】利用硝化抑制剂 3,4-二甲基吡唑磷酸盐(3,4-dimethylpyrazole phosphate, DMPP)和乙炔区分低氮和高氮黑土氨氧化细菌、氨氧化古菌和完全氨氧化菌对土壤硝化作用的相对贡献。【方法】基于黑土长期定位实验研究平台, 以不施加氮肥(低氮土壤)和施加氮肥(高氮土壤)的黑土为研究对象, 采用微宇宙培养实验和定量 PCR 技术, 分析抑制剂添加对土壤有效态氮、氨氧化微生物丰度的影响及两者的关系。【结果】低氮黑土氨氧化微生物主要由氨氧化古菌和完全氨氧化细菌 Clade B 占主导, 而高氮黑土主要由氨氧化细菌和完全氨氧化细菌 Clade A 占主导。硝化抑制剂 DMPP 和乙炔均显著抑制土壤氮的氧化, 且在高氮土壤中更为明显, 乙炔的抑制效果大于 DMPP。另外, 添加乙炔显著降低了低氮土壤氨氧化古菌、氨氧化细菌和完全氨氧化菌 Clade B 的丰度; 而在高氮土壤中, 硝化抑制剂 DMPP 则对土壤氨氧化细菌和完全氨氧化菌 Clade A 有显著抑制作用。相关分析表明, 低氮土壤中氨氧化细菌和古菌 *amoA* 基因丰度与土壤 NO_3^- -N 含量显著正相关和 NH_4^+ -N 含量显著负相关, 而高氮土壤中, 土壤氨氧化微生物 *amoA* 基因丰度与土壤 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 含量相关性均不显著。【结论】氮的长期输入显著改变了黑土氨氧化微生物对环境变化的响应。

关键词: 黑土; 硝化抑制剂; 完全氨氧化细菌; 硝化作用; 氮肥

资助项目: 国家自然科学基金(32171642); 福建省闽江学者奖励计划(2021)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32171642) and the Award Program for Minjiang Scholar Professorship of Fujian Province (2021).

*Corresponding author. E-mail: jpshen@fjnu.edu.cn

Received: 2024-06-30; Accepted: 2024-09-13; Published online: 2024-10-09

Nitrification inhibitors affect the abundance of ammonia-oxidizing microorganisms and nitrification in black soil in a short-term microcosm

CHANG Yuhai¹, SHEN Jupei^{*1}, WU Wenjing¹, MA Xingzhu², HAO Xiaoyu², ZHAO Yue², HE Jizheng¹

¹ State Key Laboratory for Subtropical Mountain Ecology of the Ministry of Science and Technology and Fujian Province, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, Fujian, China

² Heilongjiang Academy of Black Soil Conservation and Utilization, Harbin 150086, Heilongjiang, China

Abstract: **[Background]** The black soil area in northeast China is an important grain production base in China. However, the excessive use of chemical fertilizer has caused serious environmental issues, including nitrogen loss and environmental pollution. Nitrification, one of the key steps in nitrogen cycling, is mainly driven by microorganisms. **[Objective]** To distinguish the relative contributions of ammonia-oxidizing bacteria, ammonia-oxidizing archaea, and comammox to soil nitrification by using nitrification inhibitors 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) and acetylene in the black soil fields with low and high nitrogen content. **[Methods]** The soil samples applied with no nitrogen fertilizer (low-nitrogen soil) and nitrogen fertilizer (high-nitrogen soil) were collected from the black soil area in the long-term fertilization experiment. The effects of nitrification inhibitors on soil available nitrogen content, the abundance of ammonia-oxidizing bacteria, and their relationship were investigated by quantitative PCR of soil microcosms. **[Results]** Ammonia-oxidizing archaea and comammox Clade B predominated in the low-nitrogen soil, while ammonia-oxidizing bacteria and comammox Clade A predominated in the high-nitrogen soil. Both nitrification inhibitors, DMPP and acetylene, significantly inhibited ammonia oxidation, with more pronounced effects in high-nitrogen soil. Acetylene had a greater inhibitory effect than DMPP on ammonia oxidation. In addition, acetylene significantly reduced the abundance of ammonia-oxidizing archaea, ammonia-oxidizing bacteria, and comammox Clade B in low-nitrogen soil, while DMPP significantly inhibited ammonia-oxidizing bacteria and comammox Clade A. The correlation analysis showed that the *amoA* abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea was positively correlated with NO_3^- -N content and negatively correlated with NH_4^+ -N content in low-nitrogen soil. However, the *amoA* abundance of ammonia-oxidizing microorganisms had no significant correlation with NH_4^+ -N or NO_3^- -N content in high-nitrogen soil. **[Conclusion]** The long-term application of nitrogen altered the responses of ammonia-oxidizing microorganisms to environmental changes in black soil.

Keywords: black soil; nitrification inhibitor; comammox; nitrification; nitrogen fertilizer

氮循环是农业生态系统的关键生物地球化学循环过程。硝化作用作为氮循环的关键过程,其产生的 N_2O 和 NO_3^- -N 会造成大气污染和氮素浪费^[1-3]。硝化作用主要分为两步,即氨态氮被氧化为亚硝态氮,亚硝态氮被氧化为硝态氮^[4-5]。氨氧化过程作为硝化作用的第一步,也是整个硝化作用的限速步骤,对氮循环过程具有重要意义^[6]。氨氧化微生物(ammonia-oxidizing microorganism, AOM)是土壤硝化过程的重要驱动者之一,对农田土壤氮利用效率有重要影响^[3,7]。近百年来,人们一直认为氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)、氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)和亚硝酸盐氧化菌(nitrite-oxidizing bacteria, NOB)共同完成了整个硝化过程^[4]。我们前期大量的研究表明在酸性和低铵环境中 AOA 主导了土壤硝化过程^[7],而 AOB 则在中性和碱性高铵环境中发挥主导作用^[8-9]。另外,2015 年国际著名学术期刊 *Nature* 和 *Science* 同步发现一种能独立执行整个硝化过程的完全氨氧化硝化菌(*comammox Nitrospira*, COMX)^[10-11],这一发现打破了近百年人们对硝化过程分为两步的认识,也为研究新型氨氧化菌 COMX 和典型氨氧化菌(AOA 和 AOB)在农田生态系统对硝化作用的贡献和生态位差异提出了新的挑战^[12]。近期有研究发现 COMX 具有高底物亲和力,预示其能够在寡营养环境中生存^[13],但另有研究发现随着 pH 值的提高和 NH_4^+ -N 浓度的增加,COMX 的丰度也随之增加^[14]。由于氨氧化微生物特殊的生理生化特性,这三类氨氧化微生物在不同生境条件下存在显著的生态位分化现象。例如, Li 等^[15]研究发现 COMX Clade A 主导森林土壤硝化过程,而 Wang 等^[16]则发现 COMX Clade B 主导水稻田和森林土壤硝化过程。可见,不同氨氧化微生物类群的生态位特征及其对土壤硝化作用的贡

献尚无定论。

我国作为一个粮食大国,耕地总面积仅占全球耕地总面积的 6%,养活了全球近 20%的人口^[17],在世界粮食生产中占据至关重要的地位。然而,由于化肥的过量施用,我国也面临着严峻的土壤质量退化和环境污染等问题。例如,氮肥的过量使用会增加土壤硝化过程,从而引起土壤板结、酸化等一系列环境问题^[18-19]。化肥配施硝化抑制剂(nitrification inhibitor, NI)是减少活性氮损失、降低环境风险和提提高氮肥利用率的有效措施^[20]。有研究发现乙炔和 3,4-二甲基吡唑磷酸盐(3,4-dimethylpyrazole phosphate, DMPP)可通过与 AOM 的氨单加氧酶结合来抑制氨氧化微生物活性,从而影响土壤硝化过程^[20-21]。因此可以利用硝化抑制剂研究不同土壤微生物介导的硝化作用过程及机制。有研究发现乙炔对所有的氨氧化微生物类群活性具有抑制效果,而 DMPP 仅对 AOB 起到抑制作用^[22-23]。另有研究发现不同土壤氨氧化微生物对乙炔的响应不同。例如, Gubry-Rangin 等^[24]发现,在酸性砂壤土中添加乙炔, AOA 的生长受到抑制,但 AOB 的生长未受到影响。Liu 等^[25]在澳大利亚 3 种农业土壤中施加乙炔,发现 AOA 和 AOB 均受到抑制。此外,也有研究发现 DMPP 对 AOB 和 COMX 这 2 种微生物均有抑制作用^[22]。上述结果表明硝化抑制剂在不同土壤的抑制效应并不一致^[26],且对同一类型不同氮含量土壤的抑制效果也不明确。因此,研究在不同施肥背景下硝化抑制剂的抑制效果,有利于提高农田氮肥利用率并减少环境污染。

东北黑土区地处世界四大典型黑土区之一,土壤肥沃,适合发展农业,是我国重要的粮食生产基地^[27]。近年来,由于过度施肥和水土流失,导致黑土地肥力不断下降^[28]。为明确长期氮输入对土壤氮有效性和氨氧化微生物的影

响,本研究以 40 多年长期定位施肥实验为研究对象,分析土壤硝化作用和氨氧化微生物丰度对长期外源氮输入响应,同时使用乙炔和 DMPP 进行微宇宙培养实验探究硝化抑制剂对不同施肥处理背景下黑土硝化作用的抑制效果及对不同氨氧化微生物类群的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 研究区概况和样品采集

土壤样品采于黑龙江省哈尔滨市黑龙江省农业科学研究院试验基地(126°35'E, 45°40'N)。样地于 1979 年开始设置长期定位试验,设置一系列不同组合的化肥和有机肥混施等施肥处理,到 2023 年已有 44 年。土壤类型为旱地黑土。该地农作物为一年一熟制,按照小麦-大豆-玉米 3 种农作物轮作^[29],施肥时间均在秋季,玉米季在秋季施肥 50%,在玉米发育的大喇叭口期追施剩余肥料。氮肥为尿素,每年施用量为 N 150 kg/hm² (以氮量计)。土壤样品采集于 2023 年 8 月,当季作物为大豆。我们采集了该样地未施肥处理(CK)和长期单独施氮处理(N)两种土壤带回实验室进行分析,并开展室内培养实验。用土钻在每个样方随机采集表层土壤(0-10 cm) 5 钻,每个处理采集 3 个重复,去除较大根和叶片等,过 2 mm 筛,分成三部分储存:第一部分土壤储存于 4 °C 用于测定土壤养分,第二部分土壤存放于-20 °C 用于微生物分析;第三部分风干后保存于室温测定土壤基本性质及微宇宙培养实验。

1.2 主要试剂和仪器

乙炔,福州新航工业气体有限公司;硫酸铵、氯化钾和 DMPP,上海麦克林生化科技股份有限公司;2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix,诺唯赞生物科技有限公司;土壤 DNA 提取试剂盒,MP Biomedicals 公司。实时

荧光定量 PCR 扩增仪,Bio-Rad 公司;NanoDrop 2000 分光光度计,赛默飞世尔科技公司;连续流动分析仪,Skalar 公司;元素分析仪,Elementar 公司。

1.3 室内微宇宙培养实验

培养实验设置前将田间样品 CK 和 N 两种处理土壤的 3 个重复分别混合均匀,随后每种土壤设置 3 种处理,分别为:(1)单独施加硫酸铵(N 150 mg/kg),简称为 CT;(2)硫酸铵(N 150 mg/kg)加乙炔(用量为 1%),简称为 ACE;(3)硫酸铵(N 150 mg/kg)加 DMPP (用量为施氮量 1.5%),简称为 DMPP,每个处理 3 个重复。具体实验步骤如下:取 10 g 风干土放入 100 mL 的圆口瓶内,然后将土壤含水量调到 10%,用封口膜封住,留置小孔,在 25 °C 恒温培养箱中预培养 7 d,其中每 2 d 按称重法补 1 次水,将土壤含水量补充到 10%。预培养完成后,根据不同处理,分别加入硫酸铵溶液、乙炔和 DMPP。将土壤质量含水量调到 20%,用丁基塞密封,所有处理放置于 25 °C 恒温培养箱中,在培养 0、5 和 10 d 后进行破坏性取样,分成两部分,一部分立即提取土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N,另一部分储存于-20 °C 用于氨氧化微生物基因丰度测定。

1.4 土壤理化性质的测定

使用 pH 计以水土比 2.5:1 测定土壤 pH 值。土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 测定:取 8 g 鲜土用 2 mol/L KCl 浸提,浸提液用定性滤纸过滤后采用连续流动分析仪测定。土壤可溶性有机碳(dissolved organic carbon, DOC)和可溶性有机氮(dissolved organic nitrogen, DON)以土水比 1:4 浸提后测定。土壤总氮(total nitrogen, TN)通过称取 0.25 g 过 100 目风干土,采用元素分析仪测定。田间土壤样品的基本理化性质见表 1。

表 1 长期田间实验土壤的基本理化性质

Table 1 Soil properties in the long-term field experiment

| 土壤性质 | CK 处理 | N 处理 |
|---|--------------|-------------|
| Soil properties | CK treatment | N treatment |
| pH | 6.59±0.06a | 5.55±0.11b |
| NH ₄ ⁺ -N (mg/kg) | 3.79±0.13b | 5.98±0.39a |
| NO ₃ ⁻ -N (mg/kg) | 7.84±1.69b | 11.15±1.71a |
| DOC (mg/kg) | 23.72±1.11a | 25.95±1.65a |
| DON (mg/kg) | 17.61±6.32a | 16.06±0.89a |
| TN (g/kg) | 0.93±0.09a | 1.02±0.09a |

不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)

Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$).

1.5 土壤 DNA 的提取

每个样品取 0.5 g 冷冻土壤,采用 Fast DNA[®] SPIN Kit for Soil 试剂盒提取土壤总 DNA。提取后的 DNA 原液采用 NanoDrop 2000 测定其浓度及纯度,用灭菌去离子水 5 倍稀释,稀释液存放于-20 °C 冰箱,以便后续使用。

1.6 氨氧化微生物基因丰度的测定

氨氧化微生物 *amoA* 基因丰度的测定采用实时荧光定量 PCR 方法,利用 CFX384 Optical Real-Time Detection System 平台测定。反应体系为 10 μL: 2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 5 μL, 前引物(10 μmol/L) 0.5 μL, 后

引物(10 μmol/L) 0.5 μL, ddH₂O 3 μL, DNA (20 ng/μL) 1 μL。引物信息见表 2。质粒的构建过程如下:利用 PCR 扩增目标产物进一步构建克隆文库获取阳性克隆子,通过测序确认后作为定量 PCR 的质粒菌株,采用试剂盒提取质粒。

AOA *amoA* 和 AOB *amoA* 的反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 3 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环,每 1 个循环检测 1 次荧光信号。完全氨氧化菌 A 分支 (comammox Clade A, COMXA) 和完全氨氧化菌 B 分支 (comammox Clade B, COMXB) 的反应条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 25 s, 72 °C 25 s, 39 个循环,每 1 个循环检测 1 次荧光信号。所有熔解曲线反应温度从 65.0 °C 到 95.0 °C,每 5 s 增加 0.5 °C。阴性对照以无菌水代替。每个样品做 2 次重复。定量 PCR 反应熔解曲线均为单峰,无特异性峰值。扩增效率介于 85%–95%, R^2 介于 0.99–1.00。

1.7 数据处理

采用 Excel 2021 对数据进行处理和分析,采用 IBM SPSS Statistics 26 进行单因子 ANOVA 分析探究不同处理间差异。采用 Origin 2024 制作土壤氨氧化微生物 *amoA* 基因丰度柱状图。采用 Excel 2021 对氨氧化微生物基因拷贝数取对数处理,使其更符合正态分布的假设,便于

表 2 PCR 扩增采用的引物及序列

Table 2 Primer and sequence used for PCR amplification

| 目标基因 | 引物 | 引物序列 | 片段 | 参考文献 |
|----------------------|--------------------------|---|--------------|-----------|
| Target gene | Primer | Primer sequence (5'→3') | Segment (bp) | Reference |
| AOA <i>amoA</i> | Arch-amoAF Arch-amoAR | STAATGGTCTGGCTTAGACGGCGCCATCCATCTGTATGT | 635 | [30] |
| AOB <i>amoA</i> | amoA-1F amoA-2R | GGGGTTTCTACTGGTGGTCCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC | 491 | [31] |
| COMXA <i>amoA</i> | CA377 C576r | GTGGTGGTGGTCBAAYTAGAAGCCCATRTARTCNGCC | 199 | [32] |
| COMXB <i>amoA</i> | CB377f C576r | GTACTGGTGGGCBAAYTTGAAGCCCATRTARTCNGCC | 199 | [32] |

后续的分析。采用 R 软件的 Mantel test (vegan 包)探究土壤中 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 含量与氨氧化微生物丰度的相关性。

2 结果与分析

2.1 长期施加氮肥对田间黑土理化因子的影响

长期施加氮肥对供试土壤(黑土)氨氧化微生物丰度有显著影响(图 1)。从 qPCR 的结果可以发现, CK 土壤氨氧化微生物功能基因丰度范围分别为每克干土 AOA *amoA* 基因 8.77×10^8 – 1.23×10^9 copies, AOB *amoA* 基因 5.09×10^7 – 6.48×10^7 copies, COMXA *amoA* 基因 1.73×10^7 – 1.82×10^7 copies, COMXB *amoA* 基因 3.87×10^7 – 7.62×10^7 copies。N 处理土壤氨氧化微生物功能基因丰度范围分别为每克干土 AOA *amoA* 基因 2.07×10^8 – 4.64×10^8 copies, AOB *amoA* 基因 3.15×10^8 – 6.48×10^8 copies, COMXA *amoA* 基因 3.16×10^7 – 1.01×10^8 copies, COMXB *amoA* 基因 4.09×10^7 – 6.79×10^7 copies。通过方差分析发现, N 处理 AOB *amoA* 和 COMXA *amoA* 丰度显著高于 CK ($P < 0.05$), 而 AOA *amoA* 丰度则显著低于 CK ($P < 0.05$)。另外, COMXB 在两个处理间无显著差异($P > 0.05$)。N 处理土壤 AOA *amoA* 和 AOB *amoA* 丰度无显著差异, COMXA *amoA* 和 COMXB *amoA* 丰度间无显著差异; 而 CK 处理 AOA *amoA* 丰度则显著高于 AOB *amoA*, 且 COMXB *amoA* 丰度显著高于 COMXA *amoA* 丰度。

2.2 短期培养下硝化抑制剂对土壤有效态氮的影响

由图 2 可以看出, 土壤 NH_4^+ -N 含量随着培养时间呈下降的趋势。相较于 0 d (CK 为 95.3 mg/kg, N 为 122.6 mg/kg), 5 d 后 CK 和 N 土样未添加 NI 的处理(CT)中 NH_4^+ -N 含量分别降低了

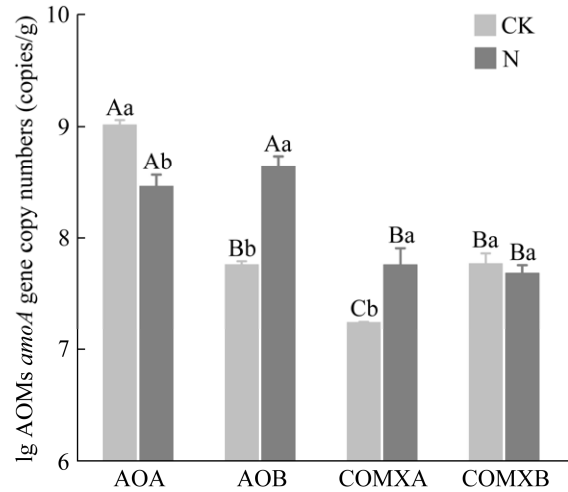


图 1 田间长期氮肥处理对土壤氨氧化微生物丰度的影响 不同小写字母表示同一种氨氧化微生物 *amoA* 基因丰度在不同施肥处理间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同一种施肥处理不同氨氧化微生物 *amoA* 基因丰度差异显著 ($P < 0.05$). CK: 不施肥处理; N: 施加氮肥处理; AOA: 氨氧化古菌; AOB: 氨氧化细菌; COMXA: 完全氨氧化菌 A 支系; COMXB: 完全氨氧化菌 B 支系. 下同

Figure 1 Effects of long-term nitrogen fertilizer addition on the abundance of soil ammonia-oxidizing microorganisms in the field experiment. Different lowercase letters in the figure indicate significant differences in the abundance of the *amoA* gene of the same ammonia-oxidizing microorganisms among different fertilization treatments ($P < 0.05$). Different uppercase letters indicate significant differences in the abundance of the *amoA* gene of the same ammonia-oxidizing microorganisms within the same fertilization treatment ($P < 0.05$). CK: No fertilization treatment; N: Nitrogen fertilization treatment; AOA: Ammonia-oxidizing archaea; AOB: Ammonia-oxidizing bacteria; COMXA: Comammox Clade A; COMXB: Comammox Clade B. The same below.

15.7%和 19.3%, 而 10 d 后 NH_4^+ -N 含量分别降低了 34.4%和 34.3%。本研究发现施加 2 种 NI 对 NH_4^+ -N 氧化均有明显的抑制作用。

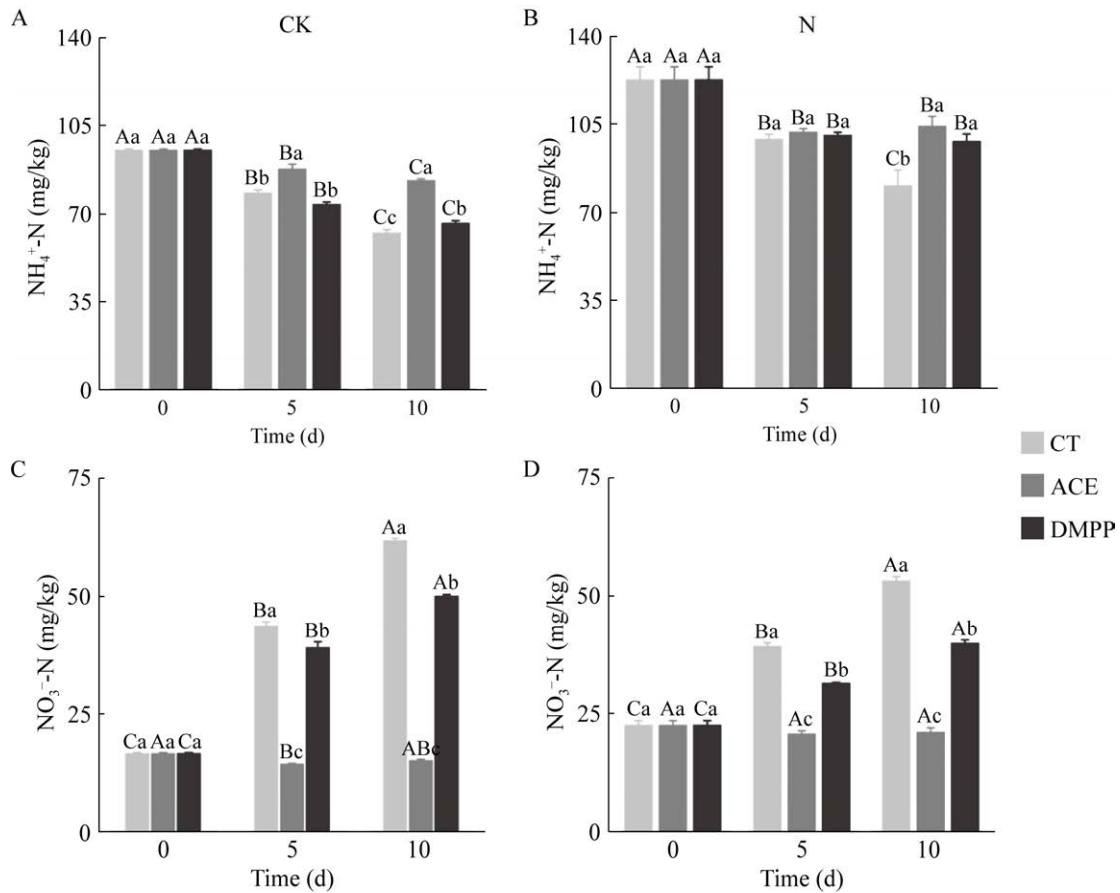


图 2 不同硝化抑制剂对土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的影响 不同小写英文字母表示同一种土壤同一培养时间下不同硝化抑制剂处理间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写英文字母表示同一种土壤同一硝化抑制剂处理不同培养时间下差异显著 ($P < 0.05$); A 和 B: $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量; C 和 D: $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量. CT: 未施加硝化抑制剂处理; ACE: 乙炔处理; DMPP: DMPP 处理. 下同

Figure 2 Effects of different nitrification inhibitors on soil $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$. Different lowercase letters in the figure indicate significant differences ($P < 0.05$) among various nitrification inhibitor treatments for the same soil at the same cultivation time. Different uppercase letters signify significant differences ($P < 0.05$) for the same soil under different cultivation times with the same nitrification inhibitor treatment. A and B: $\text{NH}_4^+\text{-N}$ content; C and D: $\text{NO}_3^-\text{-N}$ content. CT: No nitrification inhibitors applied; ACE: Acetylene treatment; DMPP: DMPP treatment. The same below.

随着培养时间的增加, 土壤 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量不断增加, 与 0 d 相比, 5 d 后 CK 和 N 土样未添加 NI 的处理中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量分别为 43.80 mg/kg 和 39.37 mg/kg, 分别升高了 161.2% 和 73.6%; 10 d 后 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量分别达到 61.80 mg/kg 和 53.20 mg/kg, 升高了 268.7% 和 134.4%。另外, 本研究发现施加 2 种 NI 对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的累积均有

明显的抑制作用, 其中乙炔的抑制效果优于 DMPP ($P < 0.05$)。

2.3 短期培养下硝化抑制剂对氨氧化微生物丰度的影响

由图 3 可以看出, 施加 NI 对长期不同施肥背景下土壤氨氧化微生物丰度的影响显著不同。在 CK 土壤中, 施加乙炔(ACE 处理)显著

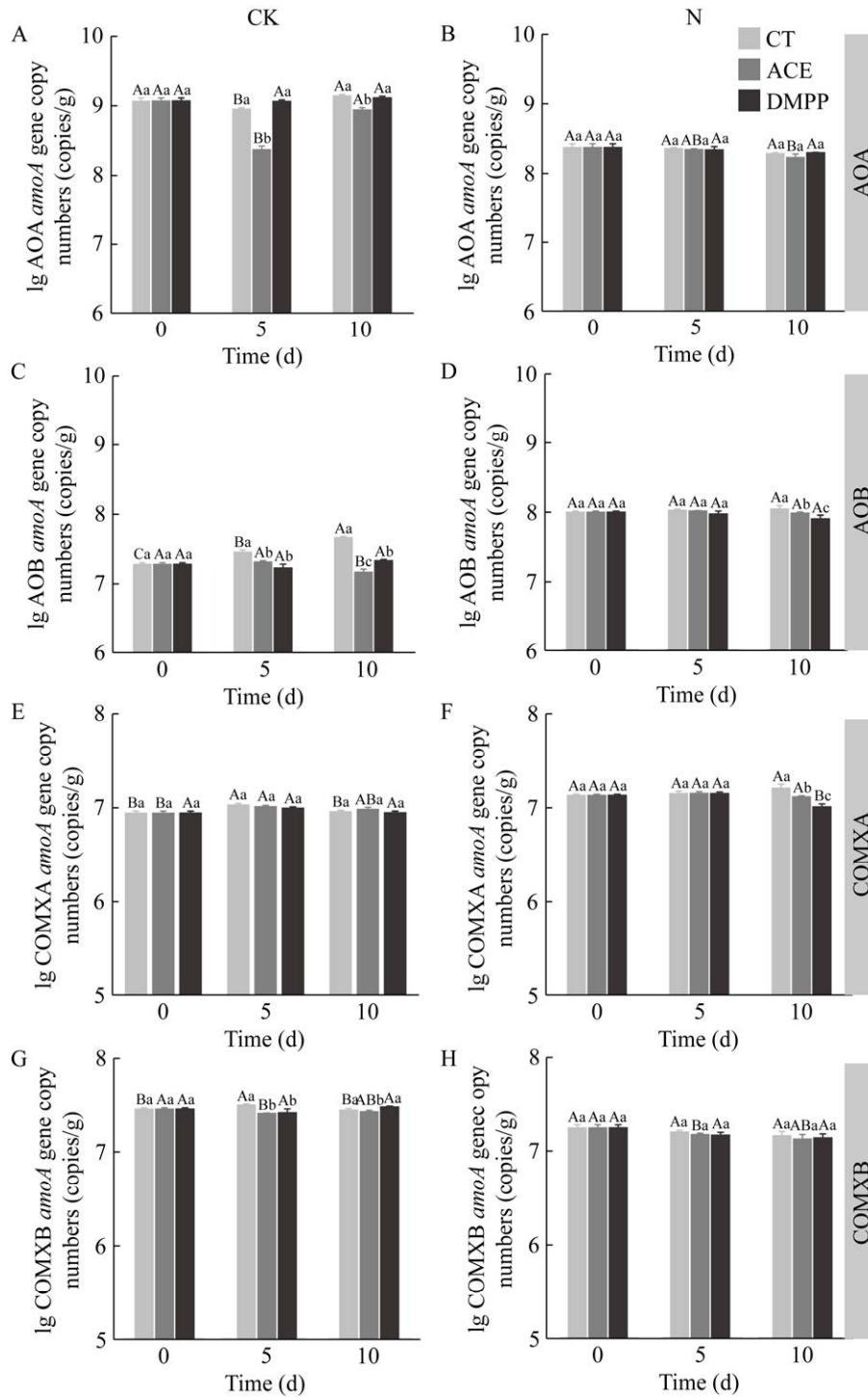


图3 不同硝化抑制剂对氨氧化微生物丰度的影响 A和B: AOA *amoA* 基因拷贝数; C和D: AOB *amoA* 基因拷贝数; E和F: COMXA *amoA* 基因拷贝数; G和H: COMXB *amoA* 基因拷贝数

Figure 3 Effects of nitrification inhibitors on the abundance of ammonia-oxidizing microorganisms. A and B: AOA *amoA* gene copy numbers; C and D: AOB *amoA* gene copy numbers; E and F: COMXA *amoA* gene copy numbers; G and H: COMXB *amoA* gene copy numbers.

降低了除 COMXA 以外的氨氧化微生物丰度 ($P<0.05$), 而施加 DMPP 仅对 AOB 和培养 5 d 的 COMXB 有显著抑制 ($P<0.05$)。相反, 在 N 土壤中, 除 DMPP 对 AOB 和 COMXA 有显著抑制外, 乙炔和 DMPP 对几种氨氧化微生物丰度均无显著影响。所有处理中, 仅有未添加 NI (CT 处理) 的 CK 土壤中 AOB *amoA* 基因丰度随着培养时间显著增加。

在 2 种土壤 (CK 和 N) 短期培养过程中, 相较于 DMPP 处理, 无 NI 处理和 ACE 处理 AOA

和 AOB 比值均显著降低 (图 4), 而 DMPP 作用下两者比值则保持不变。相反, COMXA 和 COMXB 比值在无 NI 处理和乙炔处理中显著升高, 说明 COMXA 类群的相对作用显著增加, 但在 DMPP 作用下两者比值在 2 种土壤中均显著降低。

2.4 土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量与氨氧化微生物丰度的关系

将土壤氨氧化微生物基因丰度与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量进行相关性分析, 由图 5A 可以

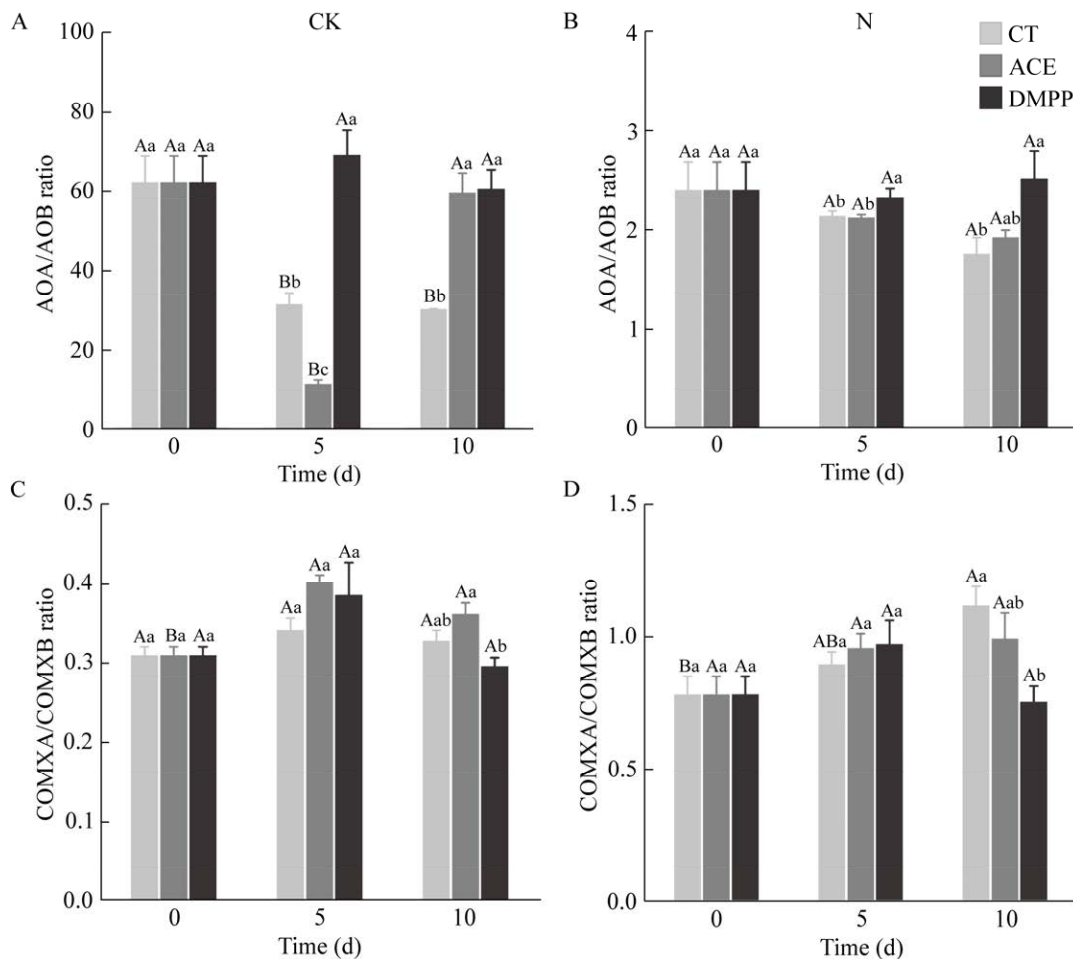


图 4 硝化抑制剂对氨氧化微生物丰度比值的影响 A 和 B: CK 和 N 处理 AOA 和 AOB 基因拷贝数比值; C 和 D: CK 和 N 处理 COMXA 和 COMXB 基因拷贝数比值

Figure 4 Effect of nitrification inhibitors on the ratio of ammonia-oxidizing microorganisms. A and B: The ratio of AOA and AOB gene copies; C and D: The ratio of COMXA and COMXB gene copies.

看出, 在 CK 土壤中, AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度与土壤 NO_3^- -N 含量呈显著正相关($P < 0.01$), 与土壤 NH_4^+ -N 含量呈显著负相关($P < 0.05$)。而在 N 土壤中, 所有氨氧化微生物类群的丰度与土壤 NO_3^- -N 含量相关性均不显著。

3 讨论

近年来, 探析以 AOA 和 AOB 经典氨氧化微生物和以 COMX 为代表的新型氨氧化微生物的生态位分化特征已成为农田生态系统的研究热点。本研究发现黑土 AOA 的丰度显著高于其他氨氧化微生物丰度, 这与我们以往在红壤、黑土等结果较为一致^[9,33]。同时, 长期氮肥输入的土壤中 AOA 的丰度显著降低, 而 AOB 的丰度显著增加(图 1), 且土壤中 AOA/AOB 的比率显著降低(图 4), 这一发现与之前的研究结果一

致^[34], 主要是由于长期施加氮肥后土壤 NH_4^+ -N 含量增加, 高 NH_4^+ -N 环境抑制 AOA 但促进 AOB 的生长^[35]。CK 和 N 的土壤中施加硫酸铵后, AOB 的丰度都显著提高, 而 AOA 的丰度并无显著变化, 这一结果也支持上述结论。本研究也发现, COMXA 的丰度显著低于 COMXB 的丰度, 这与 Xu 等^[36]在中国典型农业土壤中研究结果相反, 原因可能是两者的土壤 NH_4^+ -N 含量具有显著差异所致。大量研究表明土壤 NH_4^+ -N 是影响氨氧化微生物生态位分化的重要因素^[14,35]。另外, 我们发现高氮土壤 COMXA/COMXB 比值显著高于低氮土壤, 且短期室内实验中添加外源氮后, 随着培养时间 COMXA/COMXB 比值逐渐增加, 说明 COMXA 对高铵环境具有偏好, 而 COMXB 在高铵环境生长受限^[17]。

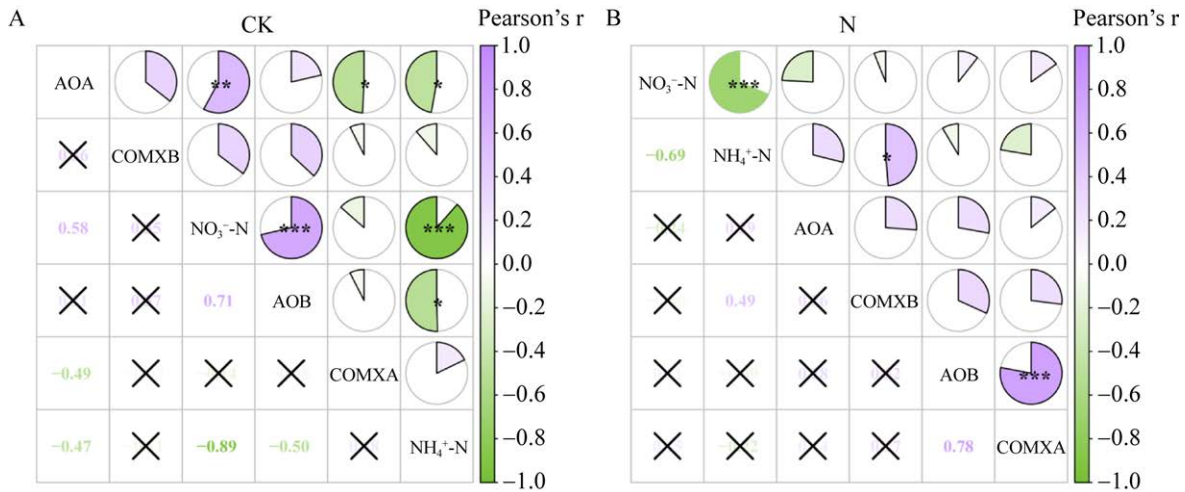


图 5 短期培养实验下氨氧化微生物丰度与土壤 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 含量的相关性 A: CK 土壤氨氧化微生物丰度与土壤 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 含量相关性; B: N 土壤氨氧化微生物丰度与土壤 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 含量相关性。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Figure 5 Relationship between the abundance of ammonia-oxidizing microorganisms, soil NH_4^+ -N and NO_3^- -N contents in microcosm. A: Correlation between the abundance of ammonia-oxidizing microorganisms with NH_4^+ -N and NO_3^- -N contents in CK soil; B: Correlation between the abundance of ammonia-oxidizing microorganisms with NH_4^+ -N and NO_3^- -N contents in N soil. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

已有大量研究表明 NI 通过抑制氨氧化微生物和亚硝酸氧化菌的活性,降低土壤 NO_3^- -N 和 N_2O 的生成,减少氮素流失和降低环境污染,提高氮肥利用效率,增加作物产量^[37-38]。本研究发现,NI (乙炔和 DMPP)的添加会显著降低土壤中 NH_4^+ -N 氧化和 NO_3^- -N 的累积(图 2)。这与前人在农业土壤研究结果一致^[38-39],原因主要分为两点:(1) 乙炔和 DMPP 可以与氨氧化微生物的氨单加氧酶(AMO)竞争结合,从而抑制氨氧化微生物活性,减少 NH_4^+ -N 向 NO_2^- -N 的转化^[23,38]; (2) 乙炔可以通过抑制亚硝酸盐氧化菌的活性来减少 NO_2^- -N 向 NO_3^- -N 的转化^[40]。本研究发现在 CK 和 N 土壤中施加乙炔对 4 种氨氧化微生物丰度都有不同程度的抑制作用(图 3),这与 Tan 等^[22]在河北、河南和广州 3 种土壤施加乙炔对 4 种氨氧化微生物都有抑制作用的结果相似,主要原因在于乙炔作为短链烃类可以与氨氧化微生物氨单加氧酶活性位点结合,阻止氨氧化过程的进行^[41]。此外,施加 DMPP 后 AOA/AOB 丰度显著高于其他处理(图 4),可能原因是施加 DMPP 会对 AOB 产生抑制效果,而并未对 AOA 产生抑制效果^[22-23]。虽然对 NI 的研究已经开展较多^[37-39,41-42],但对不同背景土壤使用的 NI 的抑制机制和差异的认识还不一致。例如,Zhou 等^[38]在黑龙江水稻土壤中发现 DMPP 仅对 AOB 起抑制作用,但 Tan 等^[22]在河北农田发现 DMPP 对 AOB 和 COMX 都起到抑制作用。我们的研究发现 DMPP 对 2 种土壤 AOB 均有显著抑制作用,而仅对高氮土壤 COMXA 起到抑制作用。这种差异的主要原因在于 NI 在不同的环境中发挥的作用不同^[42]。此外,制定合理的 NI 用量也是今后需要进一步关注和明确的内容。另外,本研究发现 DMPP 对 NH_4^+ -N 氧化和 NO_3^- -N 生成的抑制效果明显弱于乙炔,且随着培养时间的增加,抑

制效果逐渐减弱。这与前人的研究结果一致,主要原因有以下几点:(1) DMPP 与乙炔虽然都能与 AMO 结合,但 DMPP 与氨单加氧酶结合是可逆的,因此随着培养天数增加,对硝化作用抑制效果减弱^[42]。(2) 有研究表明乙炔对经典氨氧化微生物的活性和丰度都有影响,而 DMPP 仅对 AOB 的活性和丰度起抑制作用^[43],导致 DMPP 的抑制效果不如乙炔。(3) DMPP 在土壤中抑制作用的稳定性更容易受到土壤理化因子的影响,因此当土壤环境发生变化的时候会影响 DMPP 的抑制效果^[44]。本研究 N 处理土壤中由于氮肥长期输入土壤 pH 降低了 15.87%,从而影响了 NI 对微生物丰度的抑制^[45]。

本研究发现短期培养实验 CK 土壤 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 含量与经典氨氧化微生物(AOA 和 AOB)丰度显著相关(图 5A),而在 N 土壤中,两者的相关性并不显著,这可能与长期氮输入背景下 2 种土壤氨氧化微生物类群的差异及对外源氮响应的不同有关。同时我们发现 CK 和 N 土壤施加硫酸铵培养 10 d 后, N 土壤中 NO_3^- -N 增加的幅度明显低于 CK 土壤(图 2),进一步说明 2 种土壤氨氧化微生物的生态位分化特征。样地黑土受到长达 40 多年的 N 添加,尽管本研究中 8 月份田间样品 N 处理仅是 CK 处理有效氮的 1.4 倍,但两者 4 月份的差异高达 3.5 倍^[46]。长期富 N 环境改变了土壤氨氧化微生物的群落结构,特别是对高铵的敏感菌株(例如 AOA)^[24]。另外也有可能是由于黑土中不同谱系的氨氧化微生物对不同氮源代谢偏好性差异有关^[47],后续有待更多的研究证明这一结论。

4 结论

- (1) 长期施加氮肥显著增加了 AOB 的丰度,但降低了 AOA 的丰度。
- (2) 施加 NI 会显著降低土壤中 NH_4^+ -N 消

耗和 NO_3^- -N 生成, 乙炔对硝化作用抑制效果显著高于 DMPP。

(3) 在低氮土壤, 施加乙炔会抑制除 COMXA 以外的氨氧化微生物丰度, DMPP 仅降低 AOB 的丰度, 而在高氮土壤中硝化抑制剂对氨氧化微生物的作用较弱。

REFERENCES

- [1] SUN RB, GUO XS, WANG DZ, CHU HY. Effects of long-term application of chemical and organic fertilizers on the abundance of microbial communities involved in the nitrogen cycle[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 95: 171-178.
- [2] BURGER M, JACKSON LE, LUNDQUIST EJ, LOUIE DT, MILLER RL, ROLSTON DE, SCOW KM. Microbial responses and nitrous oxide emissions during wetting and drying of organically and conventionally managed soil under tomatoes[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2005, 42(2): 109-118.
- [3] ZHANG LM, HU HW, SHEN JP, HE JZ. 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.
- [4] COSTA E, PÉREZ J, KREFT JU. Why is metabolic labour divided in nitrification?[J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(5): 213-219.
- [5] PROSSER JI. Autotrophic nitrification in bacteria[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 1990, 30: 125-181.
- [6] KOWALCHUK GA, STEPHEN JR. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 485-529.
- [7] HE JZ, SHEN JP, ZHANG LM, ZHU YG, ZHENG YM, XU MG, DI HJ. 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.
- [8] SHEN JP, ZHANG LM, DI HJ, HE JZ. A review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chinese soils[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 296.
- [9] SHEN JP, ZHANG LM, ZHU YG, ZHANG JB, HE JZ. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1601-1611.
- [10] DAIMS H, LEBEDEVA EV, PJEVAC P, HAN P, HERBOLD C, ALBERTSEN M, JEHLICH N, PALATINSZKY M, VIERHEILIG J, BULAEV A, KIRKEGAARD RH, von BERGEN M, RATTEI T, BENDINGER B, NIELSEN PH, WAGNER M. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 504-509.
- [11] van KESSEL MA, SPETH DR, ALBERTSEN M, NIELSEN PH, OP den CAMP HJ, KARTAL B, JETTEN MSM, LÜCKER S. Complete nitrification by a single microorganism[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 555-559.
- [12] HU HW, HE JZ. Comammox: a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2017, 17(12): 2709-2717.
- [13] SAKOULA D, KOCH H, FRANK J, JETTEN MSM, van KESSEL MAHJ, LÜCKER S. Enrichment and physiological characterization of a novel comammox *Nitrospira* indicates ammonium inhibition of complete nitrification[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(4): 1010-1024.
- [14] LIU HY, HU HW, HUANG X, GE TD, LI YF, ZHU ZK, LIU XM, TAN WF, JIA ZJ, DI HJ, XU JM, LI Y. Canonical ammonia oxidizers, rather than comammox *Nitrospira*, dominated autotrophic nitrification during the mineralization of organic substances in two paddy soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 156: 108192.
- [15] LI CY, HU HW, CHEN QL, CHEN DL, HE JZ. Niche differentiation of clade A comammox *Nitrospira* and canonical ammonia oxidizers in selected forest soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 149: 107925.
- [16] WANG ZH, CAO YQ, ZHU-BARKER X, NICOL GW, WRIGHT AL, JIA ZJ, JIANG XJ. Comammox *Nitrospira* clade B contributes to nitrification in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 135: 392-395.
- [17] ZHU WB, JIA SF, DEVINENI N, LV AF, LALL U. Evaluating China's water security for food production: The role of rainfall and irrigation[J]. *Geophysical Research Letters*, 2019, 46(20): 11155-11166.
- [18] OUYANG Y, NORTON JM, STARK JM, REEVE JR, HABTESELASSIE MY. Ammonia-oxidizing bacteria are more responsive than Archaea to nitrogen source in an agricultural soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 96: 4-15.
- [19] WANG C, GUO L, CAI ZJ, CHEN J, SHEN RF. Different contributions of rare microbes to driving soil

- nitrogen cycles in acidic soils under manure fertilization[J]. *Applied Soil Ecology*, 2024, 196: 105281.
- [20] DI HJ, CAMERON KC, SHERLOCK RR, SHEN JP, HE JZ, WINEFIELD CS. Nitrous oxide emissions from grazed grassland as affected by a nitrification inhibitor, dicyandiamide, and relationships with ammonia-oxidizing bacteria and archaea[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2010, 10(5): 943-954.
- [21] HINK L, NICOL GW, PROSSER JI. Archaea produce lower yields of N₂O than bacteria during aerobic ammonia oxidation in soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(12): 4829-4837.
- [22] TAN C, YIN C, ZHANG L, ZENG Y, GUBRY-RANGIN C, CHEN H, GAO ZX, PENG HY, LI TQ, LIANG YC. Deciphering the functional importance of comammox vs. canonical ammonia oxidisers in nitrification and N₂O emissions in acidic agricultural soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2024, 193: 109415.
- [23] ZERULLA W, BARTH T, DRESSEL J, ERHARDT K, HORCHLER von LOCQUENGIEN K, PASDA G, RÄDLE M, WISSEMEIER A. 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP): a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 34(2): 79-84.
- [24] GUBRY-RANGIN C, NICOL GW, PROSSER JI. Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 74(3): 566-574.
- [25] LIU R, HAYDEN H, SUTER H, HE JZ, CHEN DL. The effect of nitrification inhibitors in reducing nitrification and the ammonia oxidizer population in three contrasting soils[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2015, 15(5): 1113-1118.
- [26] LIU R, HAYDEN HL, HU HW, HE JZ, SUTER H, CHEN DL. Effects of the nitrification inhibitor acetylene on nitrous oxide emissions and ammonia-oxidizing microorganisms of different agricultural soils under laboratory incubation conditions[J]. *Applied Soil Ecology*, 2017, 119: 80-90.
- [27] SONG XD, YANG F, JU B, LI DC, ZHAO YG, YANG JL, ZHANG GL. The influence of the conversion of grassland to cropland on changes in soil organic carbon and total nitrogen stocks in the Songnen Plain of Northeast China[J]. *CATENA*, 2018, 171: 588-601.
- [28] LIU XB, ZHANG XY, WANG YX, SUI YY, ZHANG SL, HERBERT SJ, DING G. Soil degradation: a problem threatening the sustainable development of agriculture in Northeast China[J]. *Plant, Soil and Environment*, 2010, 56(2): 87-97.
- [29] DENG HY, MA XZ, LIU ZK, HU HW, DI HJ, LIU YJ, SHI SJ, HAO XY, ZHAO Y, HE JZ, SHEN JP. Soil ecosystem multifunctionality is strongly linked with crop yield after four decades chemical fertilization in black soil[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2024, 368: 109007.
- [30] FRANCIS CA, ROBERTS KJ, BEMAN JM, SANTORO AE, OAKLEY BB. 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.
- [31] ROTTHAUWE JH, WITZEL KP, 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.
- [32] JIANG R, WANG JG, ZHU T, ZOU B, WANG DQ, RHEE SK, AN D, JI ZY, QUAN ZX. Use of newly designed primers for quantification of complete ammonia-oxidizing (comammox) bacterial clades and strict nitrite oxidizers in the genus *Nitrospira*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(20): e01775-20.
- [33] SHEN JP, ZHANG LM, HE JZ. Contrasting response of nitrification capacity in three agricultural soils to N addition during short-term incubation[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2014, 14(11): 1861-1868.
- [34] ANNING DK, GHANNEY P, QIU HZ, ABALORI TA, ZHANG CH, LUO CY. Stimulation of soil organic matter fractions by maize straw return and nitrogen fertilization in the Loess Plateau of Northwest China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2023, 191: 105061.
- [35] YANG XD, NI K, SHI YZ, YI X, JI LF, MA LF, RUAN JY. Heavy nitrogen application increases soil nitrification through ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea in acidic tea (*Camellia sinensis* L.) plantation soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 717: 137248.
- [36] XU SY, WANG BZ, LI Y, JIANG DQ, ZHOU YT, DING AQ, ZONG YX, LING XT, ZHANG SY, LU HJ. Ubiquity, diversity, and activity of comammox *Nitrospira* in agricultural soils[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 706: 135684.
- [37] PAPAPOPOULOU ES, BACHTSEVANI E, LAMPRONIKOU E, ADAMOUE E, KATSAOUNI A,

- VASILEIADIS S, THION C, MENKISSOGLU-SPIROUDI U, NICOL GW, KARPOUZAS DG. Comparison of novel and established nitrification inhibitors relevant to agriculture on soil ammonia- and nitrite-oxidizing isolates[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 581283.
- [38] ZHOU X, WANG SW, MA ST, ZHENG XK, WANG ZY, LU CH. Effects of commonly used nitrification inhibitors—dicyandiamide (DCD), 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP), and nitrapyrin—on soil nitrogen dynamics and nitrifiers in three typical paddy soils[J]. *Geoderma*, 2020, 380: 114637.
- [39] RUSER R, SCHULZ R. The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide (N₂O) release from agricultural soils: a review[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2015, 178(2): 171-188.
- [40] ZHAO JK, LEI SH, CHENG GW, ZHANG J, SHI BF, XIE ST, ZHAO JQ. Comparison of inhibitory roles on nitrite-oxidizing bacteria by hydroxylamine and hydrazine during the establishment of partial nitrification[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 355: 127271.
- [41] WRIGHT CL, SCHATTEMAN A, CROMBIE AT, MURRELL JC, LEHTOVIRTA-MORLEY LE. Inhibition of Ammonia monooxygenase from ammonia-oxidizing archaea by linear and aromatic alkynes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(9): e02388-19.
- [42] BOZAL-LEORRI A, CORROCHANO-MONSALVE M, VEGA-MAS I, APARICIO-TEJO PM, GONZÁLEZ-MURUA C, MARINO D. Evidences towards deciphering the mode of action of dimethylpyrazole-based nitrification inhibitors in soil and pure cultures of *Nitrosomonas europaea*[J]. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2022, 9(1): 56.
- [43] DONG XX, ZHANG LL, WU ZJ, LI DP, SHANG ZC, GONG P. Effects of the nitrification inhibitor DMPP on soil bacterial community in a Cambisol in northeast China[J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2013, 13(3): 580-591.
- [44] SHI XZ, HU HW, HE JZ, CHEN DL, SUTER HC. Effects of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on nitrification and the abundance and community composition of soil ammonia oxidizers in three land uses[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2016, 52(7): 927-939.
- [45] CUI L, LI DP, WU ZJ, XUE Y, XIAO FR, ZHANG LL, SONG YC, LI YH, ZHENG Y, ZHANG JM, CUI YK. Effects of nitrification inhibitors on soil nitrification and ammonia volatilization in three soils with different pH[J]. *Agronomy*, 2021, 11(8): 1674.
- [46] 邓慧玉, 马星竹, 刘子恺, 刘妍霖, 郝小雨, 赵月, 贺纪正, 沈菊培. 40 a 施肥措施对黑土土壤酶化学计量特征的影响[J]. *环境科学*, 2024, 45(8): 4915-4922. DENG HY, MA XZ, LIU ZK, LIU YJ, HAO XY, ZHAO Y, HE JZ, SHEN JP. Effects of 40 years of fertilizer application on the characteristics of soil enzymatic stoichiometry in black soil[J]. *Environmental Science*, 2024, 45(8): 4915-4922 (in Chinese).
- [47] QIN W, WEI SP, ZHENG Y, CHOI E, LI XP, JOHNSTON J, WAN XH, ABRAHAMSON B, FLINKSTROM Z, WANG BZ, LI HY, HOU L, TAO Q, CHLOUBER WW, SUN X, WELLS M, NGO L, HUNT KA, URAKAWA H, TAO XY, et al. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea exhibit differential nitrogen source preferences[J]. *Nature Microbiology*, 2024, 9: 524-536.