



三峡库区消落带周期性淹水-落干对硝化微生物生态过程的影响

郭佳¹, 蒋先军^{1*}, 周雪², 孟瑶¹, 贾仲君²

¹ 西南大学资源环境学院, 重庆 400715

² 中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 210008

摘要: 【目的】明确三峡库区消落带周期性淹水-落干对土壤硝化过程及功能微生物的影响。【方法】在重庆段万州、丰都和长寿3个典型消落带区域, 分别采集淹水-落干8次、淹水-落干5次、淹水-落干0次土壤样品, 通过室内培养分析土壤硝化作用强度; 利用实时荧光定量 PCR研究不同淹水-落干周期土壤氨氧化古菌和细菌的数量变化规律; 采用DGGE分子指纹图谱和克隆文库技术研究土壤氨氧化古菌和细菌的群落组成差异。【结果】万州、丰都和长寿3个消落带中, 土壤有机质和pH含量随淹水-落干次数的增加而增加; 除长寿消落带外, 土壤硝化强度也随着淹水-落干次数的增加而增强; 随着硝化作用的发生, 氨氧化古菌和细菌数量呈上升趋势, DGGE条带数量、位置和亮度均发生明显变化; 氨氧化功能基因 *amoA* 的系统发育分析表明: 万州和丰都消落带氨氧化古菌均属于土壤类古菌Group 1.1b; 而长寿消落带则检测到少量的海洋类古菌Group 1.1a; 3个消落带的优势氨氧化细菌均属于 *Nitrosospira* 和 Cluster 0 类群。【结论】三峡库区独特的“冬蓄夏泄”管理方式, 导致淹水-落干8次的土壤经历了周期性的淹水-落干水分胁迫, 提升了土壤有机质含量和pH, 增加了土壤硝化作用强度, 并可能改变了土壤硝化微生物群落结构。

关键词: 三峡消落带, 周期性淹水-落干, 硝化作用, 氨氧化古菌, 氨氧化细菌

三峡工程可能是人类历史上最为宏大的水利工程, 它改变了天然水流条件, 使得水流流速变缓, 特别是三峡库区蓄水前后, 水位周期性涨落在库区周围形成垂直落差达30 m, 总面积为348.93 km²的消落带^[1], 分布在重庆市22个区县和湖北省4个区县^[2]。消落带最典型的特征是周期性的淹水-落干过程, 并可能导致土壤物理化学和生

物性质等发生剧烈变化^[3], 进而影响水陆生态系统的物质与能量转化过程。2003年三峡水库最高水位提高到135 m; 2006年蓄水至156 m; 2009年达到设计最高水位175 m。由于三峡库区采取“冬蓄夏泄”的水位调度方式, 导致三峡库区同一位点土壤, 淹没-落干周期次数不一致, 这种独特的水库调度方式极大改变了三峡库区生态系统结构与

基金项目: 国家自然科学基金(41271267)

*通信作者。E-mail: jiangxj@swu.edu.cn

收稿日期: 2015-09-08; 修回日期: 2015-12-06; 网络出版日期: 2015-12-24

功能^[3]。因此,周期性的淹水-落干消落带是三峡库区生态环境问题的焦点,得到了政府部门和学术界的高度关注^[4-5]。

三峡库区消落带大多属于农田生态系统,近70%为原耕地。消落带形成之前,这些旱地农田生态系统通常经历了高强度的农业管理方式,如化肥和有机肥施用,其中的尿素和铵态氮肥则在硝化微生物作用下转化为硝酸盐,蓄积于土壤之中^[6]。三峡库区蓄水之后,原耕地则成为季节性湿地,蓄积于土壤中的可溶性铵态氮和硝态氮则可能进入库区水体,对水环境质量产生一定的影响。微生物是消落带的土壤氮素转化过程的主要驱动者,但目前消落带土壤微生物,特别是分子生态学方面的相关报道较少^[7-8]。

硝化作用是全球氮循环的重要环节,包括将氨氧化为亚硝酸的氨氧化过程以及亚硝态氮进一步氧化为硝态氮的亚硝化过程,而氨氧化过程是硝化作用的限速步骤,是硝化作用的研究重点。因此硝化作用通常关注氨氧化过程,硝化微生物特指氨氧化微生物,包括氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA),而*amoA*基因则是氨氧化生态学研究常用分子靶标^[9]。基于*amoA*的分子生态学研究表明,氨氧化古菌主要分为3大类,包括海洋类群(Group 1.1a和Group 1.1a-associated)、土壤类群(Group 1.1b)以及嗜热泉古菌(ThAOA)^[10]。Group 1.1a-associated主要分布于酸性土壤,而Group 1.1b在中性和碱性土壤中数量较多。氨氧化细菌包括b变形菌*Nitrosospira*和*Nitrosomonas*以及g变形菌*Nitrosococcus*^[11-12]。b门类广泛存在于陆地生态系统,而已有的g类群全部来自于海洋环境。氨氧化细菌和古菌被认为是严格的化能无机自养好氧微生物,因此,淹水-落干可能改变土壤氧气、pH、温度和有机质环境条件,进而影响土壤硝化微生物群落结构及硝化作用强度^[13]。然而,已有的认识主要来源于对干湿交替^[14]和水稻土^[15-16]的研究。此外,长期以来由于技术手段的

限制,硝化研究大多关注其通量过程,相应的微生物机制报道较少。三峡库区土壤随着三峡工程的推进,淹水-落干次数具有明显的差异,是研究周期性淹水-落干影响硝化作用的理想样带。据此,本研究选择了三峡工程重庆段3个典型消落带,评价了周期性淹水-落干对硝化作用及氨氧化微生物的影响规律。

1 材料和方法

1.1 研究区域消落带形成特征及土壤样品采集

三峡工程蓄水经历了3个阶段,如图1所示,2003年三峡水库最高水位提高到135 m;2006年三峡枢纽工程初期运行阶段,蓄水至156 m;2009年三峡水库达到设计最高水位175 m。由于三峡水库采用“冬蓄夏泄”的水位调度方式,水库在每年汛期5-9月按照三峡工程防洪限制水位145 m的高程运行;10月进入蓄水期,一般情况下于10月底水位上升至正常的高程175 m,并在11-12月一直保持此水位;而1-4月为三峡工程的供水期,在汛期水库水位会降到消落水位156 m的高程;截至5月底,水位恢复到防洪限制水位145 m,故三峡水库夏季水位低而冬季水位高。这种独特的水库调度方式极大地改变了三峡库区生态系统结构与功能,特别是其中的土壤必然经历周期性的淹没-落干过程,且与天然河流消落带的涨落季节相反。

2014年5月,水库低水位运行、消落带处于落干季节。针对三峡库区重庆段的3个典型消落带城市(万州、丰都和长寿),开展采样。如图1所示每个城市的消落带样地包括淹水-落干周期8次、5次、0次3个不同的淹水-落干周期,每个周期设置3个样方(3个真重复土壤样品),共计9个土壤样品。以万州市淹水-落干5次土壤为例,采样具体流程如下,首先选择3个地形和地貌较为一致的3 m×3 m正方形小样方,在每个样方内开展S型采样,并利用取土器采集0-20 cm表层土壤,3点采

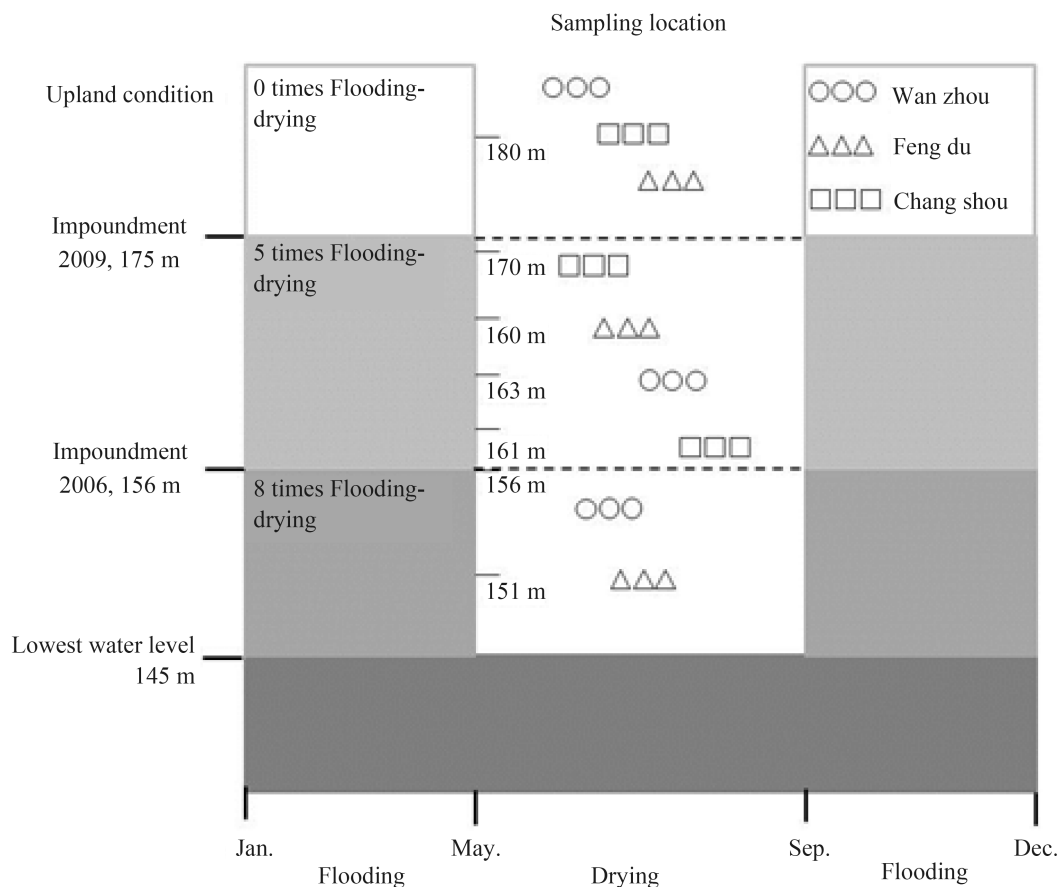


图 1. 三峡水库水位调度及采样示意图

Figure 1. The schematic diagram of sampling and water level regulation of the Three Gorges Reservoir.

样并将其混合形成一个样品。因此，3个不同城市、3个不同周期的消落带采样共计获得27个土壤样品。样品采集后轻微晾干至10%含水量，过2 mm筛，于冰箱4 °C冷藏，以备后续实验。长寿采样点由于地形限制，无法采集到淹水-落干8次样品(即145–156 m之间坡陡且已形成沼泽，无法接近采样)，但161 m与170 m处的样点垂直落差高达9 m，尽管理论上二者淹水-落干周期均为5次，但其表观土壤水分含量具有明显差异，能在一定程度上反映不同淹水-落干周期对硝化过程的影响。为叙述方便，本文中将161 m处的长寿消落带样品视为淹水-落干周期8次。

1.2 微宇宙培养实验与土壤硝化作用测定

针对每一个消落带城市，每个淹水-落干周

期，开展微宇宙土壤培养实验并设置3个真重复。具体实验设计如下：将供试土样100 g放入培养皿中，均匀加入8 mmol N/kg dry weight soil硫酸铵氮源，添加去离子水调节含水量为30% (即土壤最大持水量的60%)。将培养瓶置于28 °C恒温培养箱中黑暗培养，同时每3天测定土壤水分，确保土壤30%含水量维持稳定。在培养的第0、1、4、7、10、13天非破坏性取样，其中5 g土壤用于分析土壤pH，并采用玻璃电极法进行测定(土水比1:2.5)。另外5 g土壤用于2 mol/L KCl溶液浸提，并采用靛酚蓝比色法和分光光度计法分别测定 NH_4^+ -N和 NO_3^- -N。另外将2–3 g新鲜土壤置于–20 °C保存，用于提取土壤微生物基因组总DNA用于后续分子分析。

1.3 微生物 DNA 提取与实时荧光定量 PCR

为了确保微生物群落分析能够最大程度反映其在土壤中的真实状况, 针对每个真重复土壤样品, 分别采样3次, 提取土壤DNA后将其混合以提高后续土壤微生物群落分析的代表性。在微宇宙培养的第0、4、13天分别采集土壤样品, 利用FastDNA®Spin Kit for Soil 试剂盒提取0.5 g土壤样品, 根据公司提供的操作方法提取土壤微生物总DNA, 并将土壤DNA溶解于100 μL无菌水中, 于冰箱-20 °C保存备用。通过微量紫外分光光度计(NanoDrop®ND-1000)分析土壤微生物DNA的浓度和纯度(OD_{600}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230})。

氨氧化细菌与古菌定量PCR引物序列如表1所示。定量PCR标线采用含有古菌和细菌*amoA*基因

的克隆进行制备。利用特定引物分别扩增目的基因, 构建克隆文库后, 将含有目标基因的克隆在LB营养液中过夜培养, 利用试剂盒提取质粒纯化并测定质粒浓度, 根据摩尔常数计算目标基因的拷贝数, 并将质粒连续稀释8个数量级, 以获得各目的基因的标准曲线。实时荧光定量PCR于CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad 公司)上完成。定量PCR扩增反应体系为20 μL, 包括: 10 μL的SYBR Premix EX *Taq*™ (宝生物工程(大连)有限公司), 上、下游引物(10 pmol/μL)各0.5 μL, 1.0 μL土壤总DNA模板, 8 μL灭菌双蒸水。采用灭菌双蒸水代替DNA作为反应模板, 设置阴性对照。反应条件为: 94 °C 5 min; 35×(94 °C 45 s; 55 °C 45 s; 72 °C 1 min); 72 °C 10 min。

表1. PCR扩增引物

Table 1. Primers used in the study

Primers	Primer sequence(5'→3')	Target gene	Molecular analysis	Reference
Arch-amoAF Arch-amoAR	STAATGGTCTGGCTTAGACG GCGGCCATCCATCTGTATGT	archaeal <i>amoA</i> gene	Real time PCR	[17]
amoA-1F amoA-2R	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCGGGAAAGCCTTCTTC	bacterial <i>amoA</i> gene	Real time PCR Real time PCR, DGGE	[18]
CrenamoA23f CrenamoA616r	ATGGTCTGGCTWAGACG GCCATCCATCTGTATGTCCA	archaeal <i>amoA</i> gene	DGGE	[19]
amoA-1F-GC	CGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGG GGGCGGGGTTTCTACTGGTGGT	bacterial <i>amoA</i> gene	DGGE	[20]

1.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)与克隆文库

以第0和13天土壤总DNA为模板, 如表1所示, 利用带GC夹的引物对目的基因进行PCR扩增, 扩增产物用于DGGE电泳分离。PCR反应体系包括25 μL的SYBR GREEN, 上、下游引物(10 pmol/μL)各1.25 μL, 2.5 μL土壤总DNA模板, 20 μL灭菌双蒸水。反应条件为PCR扩增的反应条件: 94 °C 5 min; 35×(94 °C 45 s; 55 °C 45 s; 72 °C 1 min); 72 °C 10 min。氨氧化古菌采用6%的聚丙烯酰胺胶, 实验中采用的变性梯度为: 40%–55%; 氨氧化细菌采用8%的聚丙烯酰胺胶, 变性梯度为: 45%–75%。每个样品采用约150 ng

的PCR产物进行电泳。聚丙烯酰胺胶在0.5×TAE缓冲液中80 V电压下16 h。电泳完毕后, 用SYBR Green I核酸染色剂(Generay™ Biotechnology)避光染色30 min, 在凝胶成像仪上观察分析, 并利用Quantity One软件对DGGE指纹图谱进行聚类分析。针对DGGE图谱中的优势条带进行切胶回收, 但多次优化PCR条件后, 仍然无法获得目标条带的PCR产物, 据此, 我们针对典型样品土壤总DNA, 开展了克隆文库构建和分析。

选择消落带的背景零时刻土壤, 针对万州和丰都淹水-落干周期5次、长寿淹水-落干8次的样品, 构建氨氧化古菌的*amoA*克隆文库。对于氨氧

化细菌 *amoA* 基因, 则分别选择培养第13天(万州)、第0天(丰都)的土壤样品构建氨氧化细菌克隆文库。以土壤总DNA样品为模板并采用相应的引物扩增。再将其PCR产物利用pEASY-T1 Cloning Kit (TransGen Biotech)进行克隆测序。将测序结果在NCBI的GenBank数据中用BLAST进行同源性比较, 确定微生物种类。利用DNA Star软件将对序列进行合并, 按照常用相似性阈值97%, *amoA*基因序列合并后OTU过多, 因此将相似性>85%的序列进行合并。并利用MEGA 4.0软件, 进行Bootstrap验证系统发育分析, 邻接法 (Neighbor-Joining)构建系统发育树。文库Coverage C按公式: $C = 1 - n_i/N$ 计算, 采用Shannon-Wiener指数反映微生物多样性, 香农指数计算方法采用Hedrick的方法(公式1)。

$$H' = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i \quad \text{公式(1)}$$

2 结果和分析

2.1 三峡消落带不同淹水-落干周期对土壤理化性质的影响

三峡水库周期性淹水-落干, 对土壤理化性质产生了明显影响。如表2所示, 3个采样点淹水-落

干周期8次、5次和0次土壤样品中, 淹水-落干8次样品pH值均较高, 约为8.2左右。表明随着淹水-落干次数的增加, 土壤pH呈升高趋势。土壤有机质也表现出类似的规律, 特别在万州消落带, 与未淹水的旱地土壤相比, 淹水-落干8次的土壤有机质含量增加近2倍。随着淹水-落干次数的增加, 土壤全磷和全氮也呈增加趋势, 但全钾和碱解氮未表现出明显的变化规律。

2.2 三峡消落带不同淹水-落干周期对土壤硝化过程的影响

硝化微生物通过氧化氨态氮获得能量并产生硝态氮代谢产物, 土壤中硝态氮直接反映土壤硝化作用强弱。如图2所示, 在添加铵态氮底物条件下, 3个不同城市的消落带土壤都表现出明显的硝化作用, 但不同的淹水-落干周期对硝化过程具有不同的影响。背景土壤中硝态氮初始含量均较低, 在5–17 $\mu\text{g N/g dry soil}$ 之间。淹水-落干8次的土壤培养0–4 d内硝态氮含量迅速增加, 最高含量为120 $\mu\text{g N/g dry soil}$, 平均每天硝态氮净增加量约为20 mg N/g dry soil 。淹水-落干5次和0次土壤硝态氮总体增加平缓。丰都消落带样品则略有异常, 淹水-落干8次和0次的土壤硝化强度较高, 而淹水-落干5次的土壤硝化作用略低, 可能归因于丰都消落带的高pH(表2)。

表2. 供试土壤基本理化性质

Table 2. Physiochemical characteristics of the soils

Sampling site	Geographical coordinate	Flooding-drying times	Altitude/m	pH	OM/(g/kg)	TN/(g/kg)	TP/(g/kg)	TK/(g/kg)	AN/(mg/kg)
Wanzhou	108°24'59.39"(E) 30°42'45.27"(N)	8	156	8.1±0.1	21.8±4.3	0.9±0.0	0.9±0.0	20.6±0.5	75.3±7.1
		5	163	6.9±0.6	23.5±0.4	1.0±0.1	0.5±0.1	12.9±1.1	87.6±1.0
		0	180	7.0±0.4	8.0±0.0	0.5±0.1	0.3±0.0	10.5±0.1	45.9±0.0
Fengdu	107°45'15.27"(E) 29°54'14.90"(N)	8	151	8.1±0.1	15.6±2.8	0.8±0.1	0.9±0.0	18.6±0.9	58.2±7.7
		5	164	7.7±0.2	14.0±2.0	0.6±0.1	0.8±0.1	19.1±0.7	55.9±4.4
		0	180	8.0±0.1	11.4±1.9	0.8±0.1	0.8±0.1	18.8±0.3	58.8±5.1
Changshou	107°04'57.76"(E) 29°47'56.51"(N)	8	161	8.2±0.0	13.9±1.7	0.7±0.0	1.0±0.0	17.5±0.4	63.5±3.1
		5	170	8.3±0.1	8.0±1.9	0.5±0.0	0.7±0.0	16.9±0.5	30.0±7.7
		0	180	6.7±0.7	8.3±0.9	0.6±0.1	0.6±0.0	18.0±0.6	61.2±6.7

土壤中铵态氮的减少与硝态氮增加趋势恰好相反,表明土壤中铵态氮作为底物促进了微生物的硝化作用,产生了大量硝态氮。与培养零时刻相比,3个消落带不同淹水-落干周期下的土壤培养终点 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 较初始值均大量减少,一些土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量甚至降低至接近于零,表明土壤中发生了强烈的硝化作用。3个消落带淹水-落干0次的土壤中铵态氮浓度最高,且淹水-落干8次的土壤铵态氮随培养时间下降最快。这些研究结果表明

土壤总体硝化作用随淹水-落干周期的增加而升高,表明淹水-落干在一定程度上促进了土壤硝化作用。此外,土壤硝化过程通常伴随着氢离子(H^+)的释放,导致土壤pH降低。如图2所示,万州消落带淹水-落干5次和0次土壤pH随着培养时间增加呈现下降趋势,而淹水-落干8次的土壤则可能由于土壤pH极高约为8.2,具有较强的缓冲能力,故pH未随着硝化过程表现出明显的下降趋势。

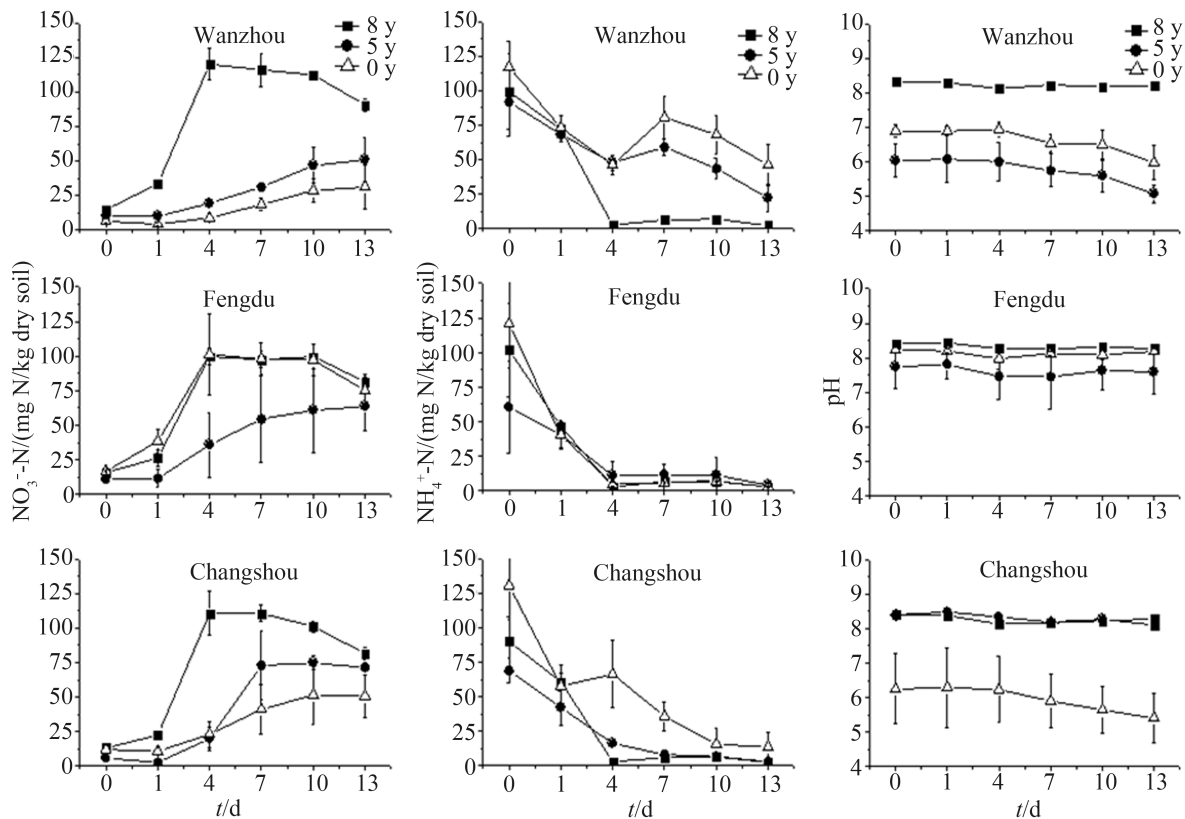


图 2. 不同淹水-落干次数土壤 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N和pH随培养时间的变化

Figure 2. Changes of NO_3^- -N, NH_4^+ -N and pH in soil of different flooding-drying times along with incubation time. The designation 8 y indicates that the sample has experienced flooding-drying for 8 times. Error bars represent the standard deviation of the nine samples examined.

2.3 三峡消落带不同淹水-落干周期对土壤硝化微生物数量的影响

硝化微生物是硝化作用的驱动者,其数量能在一定程度反映硝化作用的强弱。3个消落带不同淹水-落干周期的土壤样品中,第0天背景土壤中

氨氧化古菌(AOA)数量范围为 1.36×10^7 到 1.34×10^8 拷贝数/g *d.w.s*,氨氧化细菌(AOB)范围是 7.37×10^5 到 8.83×10^5 拷贝数/g *d.w.s*(图3)。第13天培养结束后,氨氧化古菌丰度范围为 2.56×10^7 到 3.65×10^8 拷贝数/g *d.w.s*,氨氧化细菌范围是

1.76×10^6 到 2.51×10^8 拷贝数/g *d.w.s*, 氨氧化古菌的丰度明显高于细菌。培养过程中, 氨氧化古菌和

细菌丰度均有所上升, 但是3个消落带不同淹水-落干次数的样品之间并不一致。

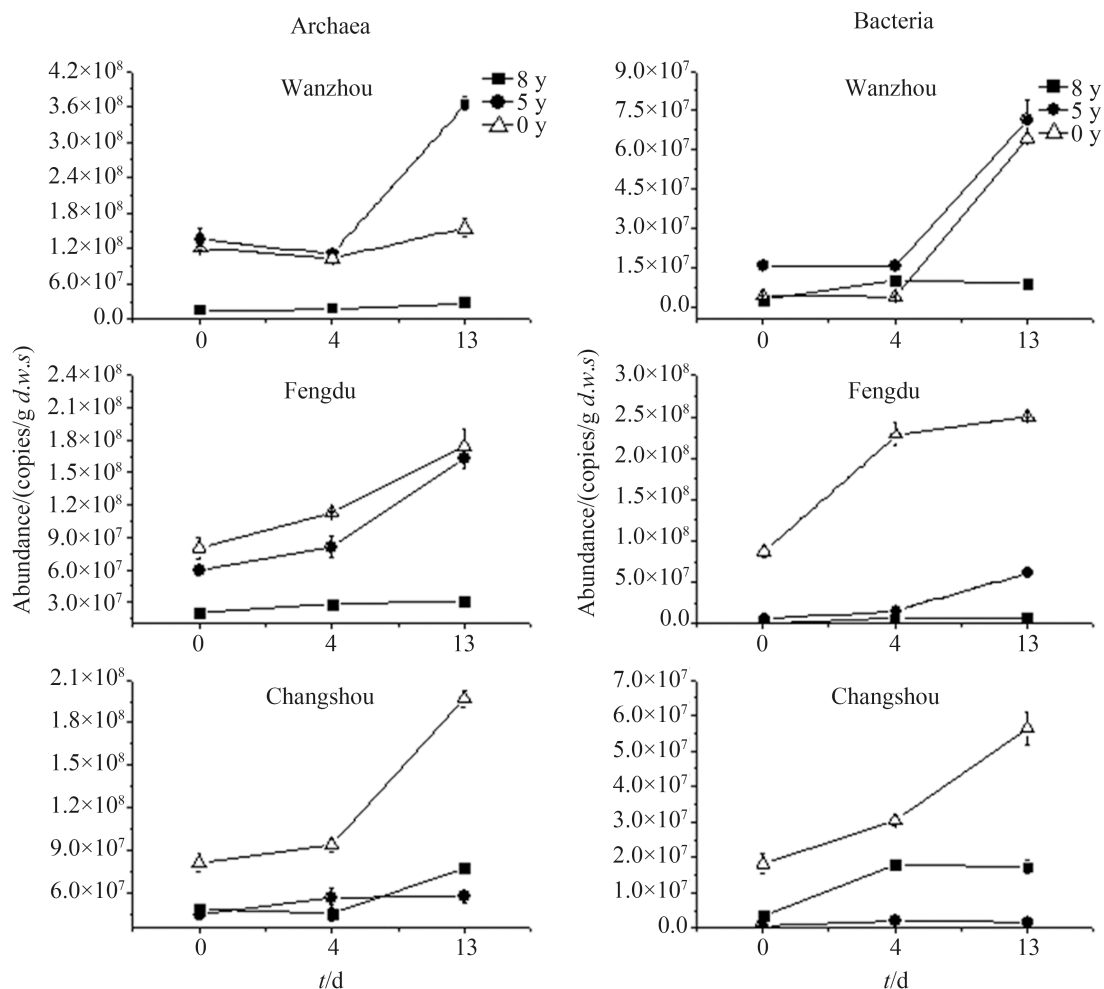


图 3. 不同淹水-落干周期氨氧化古菌和细菌丰度随培养时间变化

Figure 3. Changes of *amoA* gene copy number of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil of different flooding-drying times along with incubation time. Error bars represent the standard deviations of triplicate samples examined.

2.4 三峡消落带不同淹水-落干周期对土壤硝化微生物组成的影响

对3个消落带的土壤培养的第0、13天样品进行PCR扩增并开展DGGE分子指纹图谱分析, 获得如图4亮度不等、数量不同且位置各异的电泳条带, 表明不同消落带不同淹水-落干次数条件下的硝化微生物群落组成具有一定差异。AOA指纹图

谱中, 3个消落带不同周期差异较大, 淹水-落干8次的样品电泳条带较少, 群落结构较简单。培养第0天和13天相比较, 条带亮度、数量和位置均有一些变化, 表明无机氮源添加对氨氧化古菌群落结构产生了影响。AOB指纹图谱中, 各消落带不同淹水-落干次数的土壤优势微生物相近, 但总体仍有较大差异。培养第0天和13天相比较, 条带亮

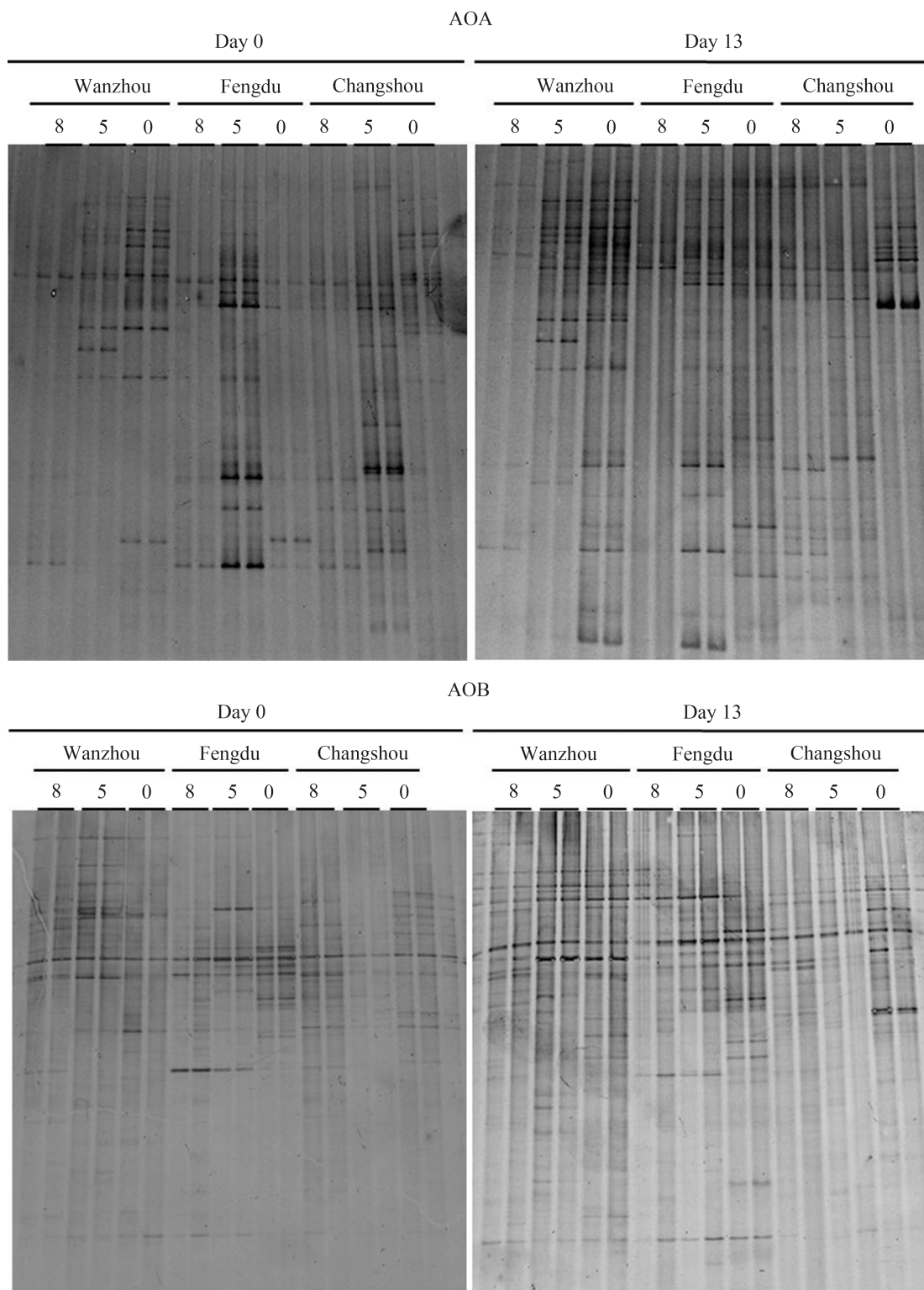


图 4. 不同淹水-落干周期土壤氨氧化古菌(AOA)和细菌(AOB)分子指纹图谱

Figure 4. DGGE fingerprints of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) in nitrifying soils representative of the hydro-fluctuation belt of the Three Gorges Reservoir.

度、数量和位置均有变化, 表明加氮源培养对氨氧化细菌群落结构产生了一些影响。

利用Quantity one软件对培养零时刻样品的DGGE图谱进行聚类分析, 得到样品聚类分析结果(如图5)。氨氧化古菌的聚类结果中可以看出同一采样点不同淹水-落干次数样品距离较远, 而最相似是长寿和丰都淹水-落干8次的2个样品, 表明三峡库区长时间周期性淹水-落干对氨氧化古菌群落结构产生了一些影响。随着未来淹水-落干的周期增加, 干湿交替的影响效应可能会大于土壤质

地等而成为影响氨氧化古菌群落结构的主要环境因子。3个采样点各自淹水-落干5次和0次样品氨氧化细菌聚类较近, 而淹水-落干8次样品不遵循这一规律。万州淹水-落干8次样品和长寿未淹水样品、长寿淹水-落干8次样品和丰都未淹水样品最接近, 表明周期性淹水-落干对氨氧化细菌群落结构影响较小。但是, 需要特别指出的是, DGGE分辨率较低^[21], 仅能反映氨氧化微生物的主要类群, 未来仍需采用先进的高通量技术, 深度测序氨氧化微生物的分子靶基因如16S rRNA和*amoA*,

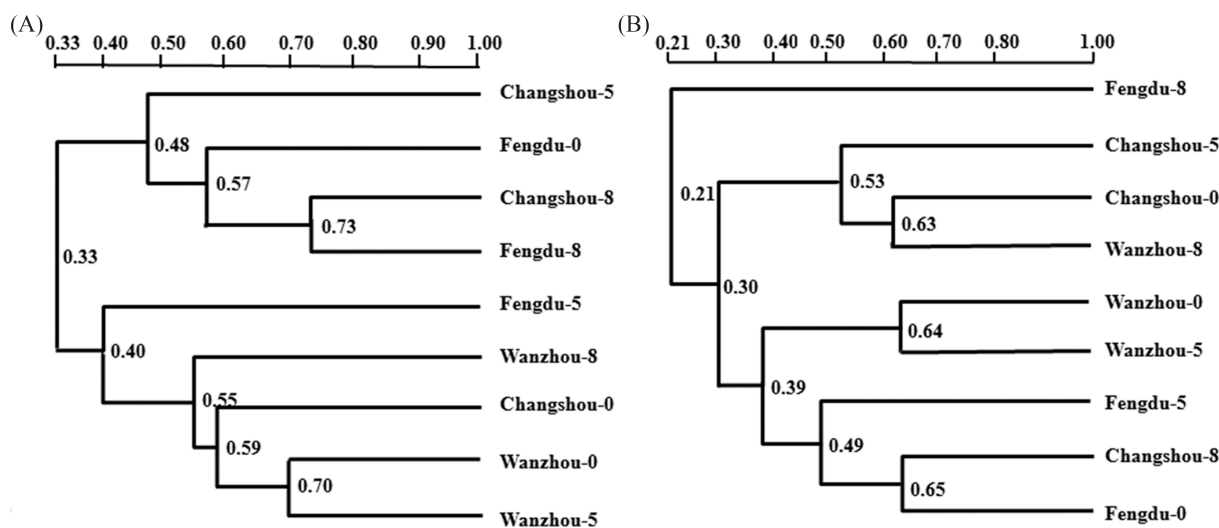


图 5. 氨氧化古菌 (A) 和细菌 (B) DGGE 图谱聚类分析

Figure 5. Cluster analysis of DGGE banding patterns of AOA (A) and AOB (B).

原位分析其转录活性及季节性变化规律, 揭示淹水-落干周期及其频度对功能微生物多样性的影响。

如图6所示, 针对万州的淹水-落干5次、丰都的淹水-落干5次和长寿的淹水-落干8次土壤, 构建氨氧化古菌克隆文库, 并进行系统发育分析。3个消落带中万州和丰都样品均属于Group 1.1b土壤氨氧化古菌类群, 未检测到Group 1.1a海洋氨氧化古菌类群和Group 1.1a-associated酸性土壤氨氧化古菌类群。长寿样品大部分属于Group 1.1b, 小部分属于Group 1.1a。选择0天丰都淹水-落干5次

和13天万州淹水-落干5次两个样品构建氨氧化细菌克隆文库, 系统发育树如图7。万州样品绝大部分属于Cluster 0, 同时也检测出*Nitrosolobus multiformus* cluster。丰都样品中检测出Cluster 0, *Nitrosopira* Nsp2 cluster和*Nitrosolobus multiformus* cluster。如表3所示, 根据OTU序列相似度85%的阈值, 将消落带土壤中氨氧化古菌和细菌的*amoA*基因克隆序列进行分析并获得了其系统发育的最亲缘序列。5个克隆样品的覆盖度Coverage C值均为100%。丰都淹水-落干5次样品氨氧化

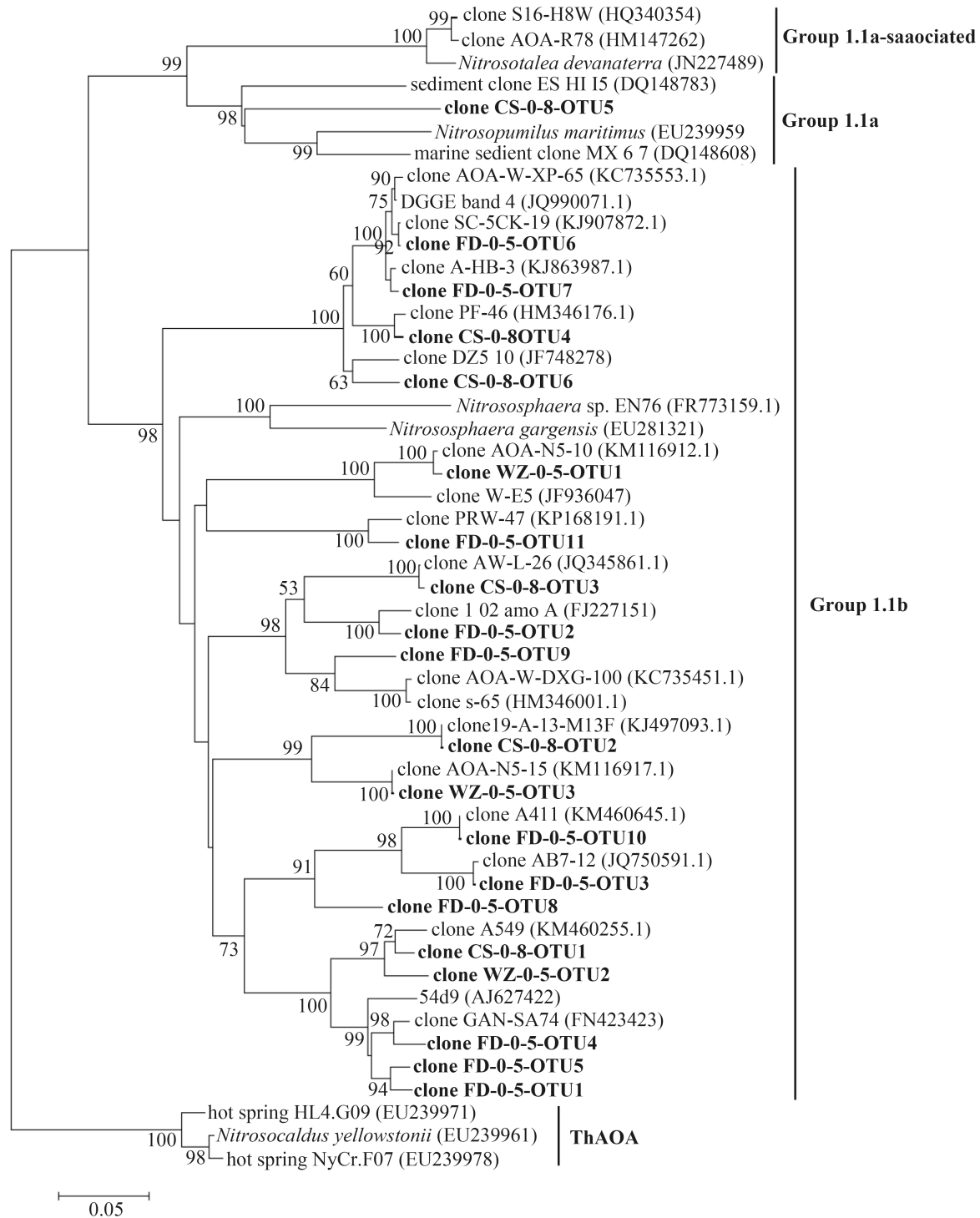


图 6. 三峡库区典型消落带土壤氨氧化古菌 (AOA) 功能基因 *amoA* 系统发育树

Figure 6. Phylogenetic tree of AOA in soil samples representative of the hydro-fluctuation belt of the Three Gorges Reservoir. Sequences from this study are shown in bold. Achaean *amoA* genes of different samples were classified into distinct OTUs with 85% sequence similarity, and one representative sequence within the OTU was selected for phylogenetic analysis. The designation 'clone CS-0-8-OTU5' indicates the samples in OTU5 are from Changshou at incubation 0 day with 8 times flooding-drying. The scale bar indicates 5 changes per 100 nucleotide acid positions. Bootstrap values higher than 50% are indicated at branch points.

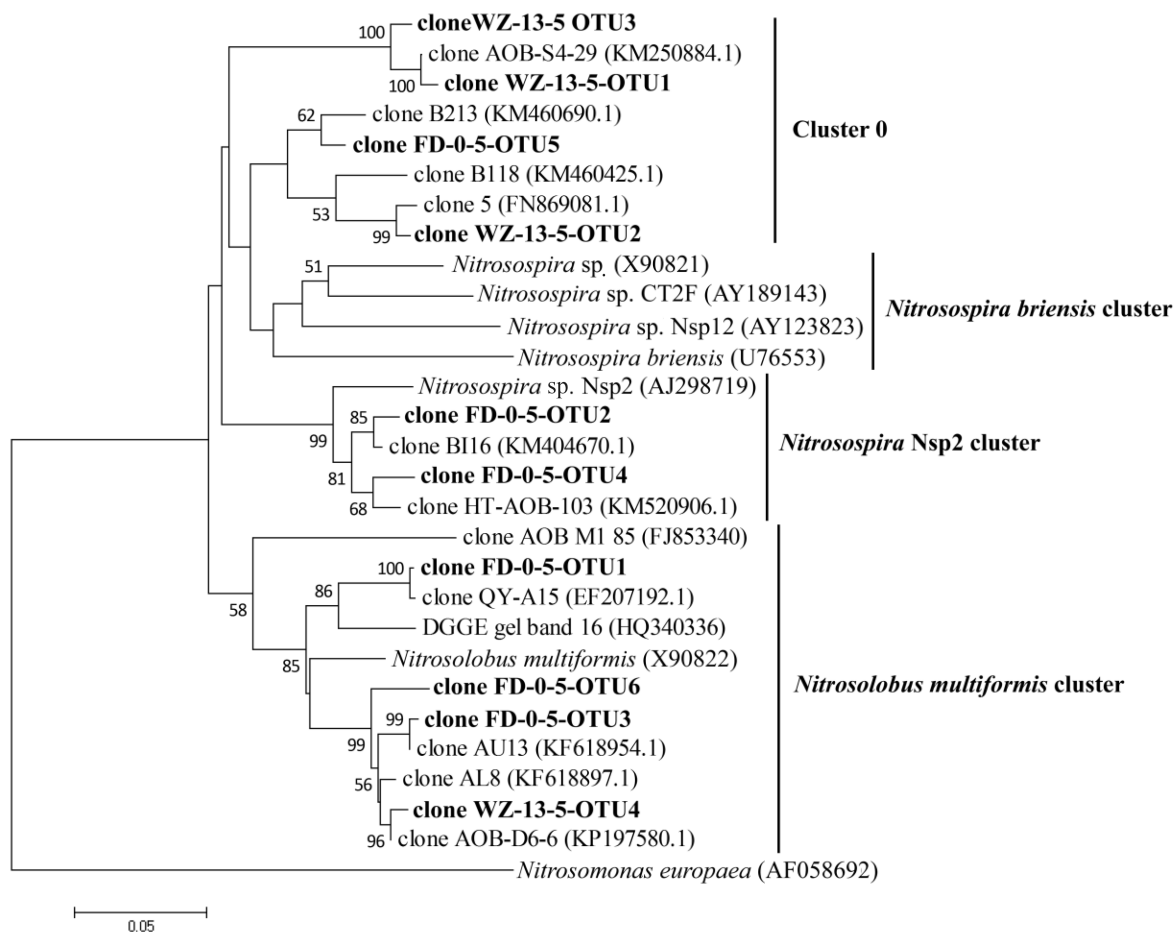


图 7. 三峡库区典型消落带土壤氨氧化细菌 (AOB) 功能基因 *amoA* 系统发育树

Figure 7. Phylogenetic tree of AOB in soil samples representative of the hydro-fluctuation belt of the Three Gorges Reservoir. Sequences from this study are shown in bold. Bacteria *amoA* genes of different samples were classified into distinct OTUs with 85% sequence similarity, and one representative sequence within the OTU was selected for phylogenetic analysis. The designation ‘clone WZ-13-5-OTU3’ indicates the samples in OTU3 are from Wanzhou at incubation 13 day with 5 times flooding-drying. The scale bar indicates 5 changes per 100 nucleotide acid positions. Bootstrap values higher than 50% are indicated at branch points.

古菌和氨氧化细菌的香农指数相对高于其他所测样品。

3 结论和讨论

土壤水分变化是陆地生态系统中普遍存在的自然现象, 而人类活动则会显著加剧这一过程。随着三峡枢纽工程的实施, 水库蓄水在2003、2006和2009年分别达到了垂直海拔135 m、156 m和175 m, 冬蓄夏泄的管理方式形成了独特的消落

带, 是库区陆域与水域之间的生态过渡与缓冲区域。由于这些消落带的形成时间不同, 导致不同海拔的土壤经历了不同的淹水-落干次数, 这种强烈的干湿交替过程, 极可能对土壤微生物产生重要影响, 并改变微生物介导的元素生物地球化学通量过程。同时, 这些消落带形成于不同时间, 也为研究淹水-落干次数对三峡库区土壤关键元素转化的演替规律提供了理想平台。通过采集淹水-落干8次和5次的土壤样品, 并与对照(淹水-落干

表3. 三峡库区消落带 *amoA* 基因克隆文库结果Table 3. Clone library summary of *amoA* gene in the hydro-fluctuation belt soils of the Three Gorges Reservoir

Sample	Total clone number	OTU	Clone number	The closest relatives NCBI accession number	Shannon index (H')
Wanzhou-0-5	51	OTU1	11	Archaeon clone AOA-N5-10 (KM116912.1)	0.337
		OTU2	36	Archaeon clone A549 (KM460255.1)	
		OTU3	4	Archaeon clone AOA-N5-15 (KM116917.1)	
Fengdu-0-5	60	OTU1	2	Thaumarchaeote clone P01-10-A8 (KM595505.1)	0.954
		OTU2	10	Archaeon clone A426 (KM460660.1)	
		OTU3	3	Archaeon clone AB7-12 (JQ750591.1)	
		OTU4	2	Archaeon clone W2A24 (KJ859250.1)	
		OTU5	7	Crenarchaeote clone NF-J-Seq7 (JQ698547.1)	
		OTU6	12	Archaeon clone A-CS-9 (KJ864239.1)	
		OTU7	10	Archaeon clone A-HB-3 (KJ863987.1)	
		OTU8	5	Archaeon clone A411 (KM460645.1)	
		OTU9	4	Crenarchaeote clone S-65 (HM346001.1)	
		OTU10	3	Archaeon clone A411 (KM460645.1)	
		OTU11	2	Crenarchaeote clone H4-G-27 (JF430506.1)	
Changshou-0-8	51	OTU1	27	Crenarchaeote clone Arc-Jul-S4 (FJ951733.1)	0.613
		OTU2	3	Crenarchaeote clone GJ-37 (KP730423.1)	
		OTU3	8	Crenarchaeote clone AW-L-26 (JQ345861.1)	
		OTU4	6	Crenarchaeote clone PF-46 (HM346176.1)	
		OTU5	3	Archaeon clone A3-20121225-03 (KC756667.1)	
		OTU6	4	Crenarchaeote clone DZ4-56 (JF748259.1)	
Fengdu-0-5	45	OTU1	3	Ammonia-oxidizing bacterium clone QY-A15 (EF207192.1)	0.616
		OTU2	3	Bacterium clone BI16 (KM404670.1)	
		OTU3	8	Bacterium clone AU13 (KF618954.1)	
		OTU4	23	Bacterium clone AOB-D6-2 (KP197576.1)	
		OTU5	6	Bacterium clone B213 (KM460690.1)	
		OTU6	2	Bacterium clone AL8 (KF618897.1)	
Wanzhou-13-5	42	OTU1	29	Bacterium clone AOB-S4-33 (KM250888.1)	0.411
		OTU2	6	Bacterium clone AOB-T140 (HQ896133.1)	
		OTU3	4	Bacterium clone AOB-S4-29 (KM250884.1)	
		OTU4	3	Bacterium clone AOB-D6-6 (KP197580.1)	

0次)相比, 本研究表明随着淹水-落干次数的增加, 土壤有机质含量明显增加, 土壤pH和硝化作

用均呈增加趋势, *Nitrosospira* 类型微生物是数量上占优势的氨氧化细菌。尽管消落带土壤中土壤

类氨氧化古菌Group 1.1b在数量上占优势,但同时也发现了少量的海洋类氨氧化古菌Group 1.1a,表明三峡库区的水分管理方式对土壤硝化微生物生理生态过程产生了明显影响。

硝化作用是土壤中氮素转化的重要过程,对生态系统中氮素循环有着至关重要的影响。环境因子包括pH、底物浓度、有机质、水分、温度和土地利用方式都会对硝化作用产生影响。硝化作用主要由氨氧化微生物完成,环境因子通过改变氨氧化微生物的生理活性,进而影响硝化作用强度。有研究表明环境因子例如铵浓度、温度、施肥处理、土壤类型、重金属胁迫、氧气和水分等变化,会对微生物种群数量、群落结构和活性产生影响^[22]。例如目前大多研究认为氨氧化古菌能更好适应低氧和低氨的逆境胁迫,而氨氧化细菌则在高pH土壤和好氧旱地土壤中发挥了重要作用^[23]。三峡库区长时间周期性淹水-落干对消落带土壤的影响尤为直接,其水位周期性涨落对土壤水分、氧气甚至pH和有机质都会产生影响。大量研究表明干湿交替对土壤氮素转化、物理性质和微生物学特性会产生影响^[24]。张燕等研究了不同干涸-淹水条件下沟渠底泥对水体铵态氮的净化作用,发现经过干涸处理的沉积物对铵态氮的去除率明显高于连续淹水方式,表明风干-淹水过程促进了氨氧化微生物的活性,更加高效地驱动了氨氧化过程^[25]。然而,落干过程中,土壤及其中的微生物极可能与空气接触并处于好氧状态,氧气作为电子受体并主导了复杂土壤的微生物生理生态过程,驱动了土壤元素转化,如本研究中硝化微生物在氨氧化过程中发挥了重要作用。但在淹水状态下,空气中仅有微量的氧气能够穿过水层并扩散进入土壤,导致土壤中厌氧过程成为主导过程,如厌氧反硝化微生物过程。尽管本实验未开展厌氧过程研究,但已有类似的报道表明干湿交替会引起土壤硝化作用和反硝化作用交替进行,加速土壤氮素矿化并加快土壤氮素损失过

程^[26]。土壤氮素转化是地球氮循环的关键环节,包括土壤生物固氮、氮素矿化、生物固持、硝化过程,反硝化损失等过程,微生物是土壤氮素转化的唯一作用者,在系统的水平同时研究不同氮素转化过程,揭示生理特点完全不同的生理类群在氮素转化过程中的作用,特别是对周期性淹水-落干的响应与适应规律,不仅具有重要的生态环境意义,也是微生物生态学的前沿问题之一。

水是生物生命存在和延续的基本物质,土壤水分变化必然对其微生物产生影响^[27]。三峡库区原位环境中的淹水-落干过程,微生物细胞可能发生相应的变化,冬蓄夏泄长达一年的周期过程中,淹水-落干导致的环境变化是一个渐进过程,微生物的适应于响应机制仍不清楚^[28]。干旱后期土壤微生物量较低,部分微生物死亡。重新湿润后,死亡微生物又刺激微生物生长。针对森林土壤的短期28 d培养实验表明,在加水恢复过程中,大多数风干土壤样品中,氨氧化细菌和古菌的数量都有增加趋势,但群落结构并未发生明显改变^[29]。然而,长期的淹水-落干则可能改变土壤微生物群落结构,例如,我们的研究表明,土壤类氨氧化古菌Group 1.1b是江西旱地红壤中的优势古菌,但淹水植稻50余年后,海洋类氨氧化古菌Group 1.1a-associated成为优势种群,表明长期的水稻田淹水-落干农业管理导致硝化微生物群落发生了明显演替^[30]。已有的研究发现细菌主导了中碱性土壤氨氧化过程^[31],而海洋类氨氧化古菌Group 1.1a-associated则主导了酸性土壤氨氧化过程^[32-34]。但是中碱性土壤中土壤类氨氧化古菌Group 1.1b数量远高于氨氧化细菌,最高甚至可达3000倍^[35-36]。我们最近的研究表明,淹水的中性稻田土壤中,Group 1.1b古菌在氨氧化过程中发挥了重要作用,极可能是淹水导致的氧气胁迫下,古菌较之细菌能够更好地适应环境并驱动了氨氧化过程^[37]。进一步针对全国尺度下的淹水稻田土壤,发现土壤氧化还原容量综合指数是表征活性

氨氧化细菌和古菌相对贡献的最佳因子, 极可能是土壤氨氧化微生物地理分异规律的关键环境驱动力^[38]。因此, 本研究中发现的土壤类氨氧化古菌Group 1.1b极有可能适应了周期性淹水-落干的胁迫, 并在氨氧化过程中发挥了重要作用。同时, 本消落带土壤中的亚硝化螺菌属和Cluster 0也在淡水环境中大量报道, 被认为是土壤氮素损失的重要途径^[11]。

淹水通常导致土壤有机质积累, 氧化还原容量增加, 土壤pH升高, 已有研究表明土壤有机质与氧化还原容量与氨氧化古菌活性具有极佳的相关性, 暗示了土壤有机质极可能作为电子供体改善土壤微环境, 影响氧化还原状况并进一步改变土壤微生物活性和群落结构^[38]。但淹水-落干过程对土壤微生物的影响机制尚不清楚。例如, 本研究表明淹水-落干8次土壤的硝化作用明显高于5次, 但在冬蓄夏泄的长期水分管理过程中, 自然土壤中的氨氧化微生物如何适应水分氧气等环境胁迫, 目前仍不清楚。此外, 野外试验调查通常具有较大不确定性, 而土壤样品则具有高度的异质性, 例如, 尽管长寿消落带中, 淹水-落干8次的土壤AOA与AOB数量高于5次的土壤, 与土壤净硝化作用趋势一致。但在万州与丰都的消落带, 淹水-落干8次的土壤AOA与AOB丰度均低于5次的土壤; 但淹水-落干8次土壤净硝化作用却强于淹水-落干5次。此外, 尽管DGGE指纹图谱表明淹水-落干影响了硝化微生物群落组成(图4), 但整体变化趋势与氨氧化古菌和细菌的数量变化规律并不一致(图3), 而在长寿样品中则检测到少量的海洋类氨氧化古菌Group 1.1a, 这些特异古菌的来源与功能仍不清楚。我们推测, 在长期的淹水-落干循环过程导致淹水-落干8次样品中江水泥沙沉积渗入, 因此, 所采集的土壤样品并不能完全反映三峡蓄水前的土壤。然而, 尽管可能存在一定的土壤样品异质性和原位调查的不确定性, 重庆段3个不同城市(万州、丰都和长寿)的典型消落

带都得到了类似的趋势, 淹水-落干次数越多, 土壤有机质含量越高, 而土壤硝化作用越强, 表明三峡工程特有的冬蓄夏泄水库调节方式, 刺激了土壤硝化微生物活性。未来采用稳定性同位素示踪硝化微生物核酸DNA/RNA技术, 则能够清楚揭示土壤淹水-落干过程对活性氨氧化微生物种群的影响规律, 为三峡库区水体和消落带可持续利用管理提供科学依据。

参考文献

- [1] Su WC, Zhao CY, Yang H. Evaluation on natural conditions of water-level-fluctuating zone (WLFZ) in Three Gorges Reservoir-taking Chongqing section of three gorges reservoir as a case. *Scientia Geographica Sinica*, 2009, 29(2): 268–272. (in Chinese)
苏维词, 赵纯勇, 杨华. 三峡库区消落区自然条件及其开发利用评价——以重庆库区为例. *地理科学*, 2009, 29(2): 268–272.
- [2] Cheng H, Wu SJ, Wang XX, Jiang Y, Chen CD, Wang Y, Lyu MQ. Research progress on the effects of the Three Gorges Reservoir on the ecological environment. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2015, 23(2): 127–140. (in Chinese)
程辉, 吴胜军, 王小晓, 姜毅, 陈春娣, 王雨, 吕明权. 三峡库区生态环境效应研究进展. *中国生态农业学报*, 2015, 23(2): 127–140.
- [3] Guo QS, Kang Y, Zhao YJ, Hong M, Kong QQ, Nie BH. Changes in the contents of N, P, K, pH and organic matter of the soil which experienced the hydro-fluctuation in the Three Gorges Reservoir. *Scientia Silvae Sinicae*, 2012, 48(3): 7–10. (in Chinese)
郭泉水, 康义, 赵玉娟, 洪明, 孔倩倩, 聂必红. 三峡库区消落带土壤氮磷钾、pH值和有机质变化. *林业科学*, 2012, 48(3): 7–10.
- [4] Teng MJ, Zeng LX, Xiao WF, Zhou ZX, Huang ZL, Wang PC, Dian YY. Research progress on remote sensing of ecological and environmental changes in the Three Gorges Reservoir area, China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(12): 3683–3693. (in Chinese)
滕明君, 曾立雄, 肖文发, 周志翔, 黄志霖, 王鹏程, 佃袁勇. 长江三峡库区生态环境变化遥感研究进展. *应用生态学报*,

- 2014, 25(12): 3683–3693.
- [5] Zhou YJ, Qiu JX, Wang J, Wang XK, Wu QB. Assessment of eco-environmental vulnerability of water-level fluctuation belt in Three Gorges Reservoir area. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(24): 6726–6733. (in Chinese)
周永娟, 仇江啸, 王姣, 王效科, 吴庆标. 三峡库区消落带生态环境脆弱性评价. *生态学报*, 2010, 30(24): 6726–6733.
- [6] Fan J, Hao M, Malhi SS. Accumulation of nitrate N in the soil profile and its implications for the environment under dryland agriculture in northern China: a review. *Canadian Journal of Soil Science*, 2010, 90(3): 429–440.
- [7] Li F, Zhang WL, Liu J, Xia HJ, Wang JZ. Soil microbial activities in the water-level-fluctuating zone of Three Gorges Reservoir area during discharging period. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(4): 968–974. (in Chinese)
李飞, 张文丽, 刘菊, 夏会娟, 王建柱. 三峡水库泄水期消落带土壤微生物活性. *生态学杂志*, 2013, 32(4): 968–974.
- [8] 刘仁华, 秦洪文, 周大详, 李彦杰, 杨俊年, 甘丽萍, 杨冬梅, 刘正学. 三峡库区消落带土壤微生物在周期蓄水影响下的多样性. *江苏农业科学*, 2013, 41(6): 318–321.
- [9] Kowalchuk GA, Stienstra AW, Heilig GHJ, Stephen JR, Woldendorp JW. Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The Netherlands). *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 31(3): 207–215.
- [10] Hatzenpichler R. Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(21): 7501–7510.
- [11] Koops HP, Pommerening-Röser A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 37(1): 1–9.
- [12] Monteiro M, Séneca J, Magalhães C. The history of aerobic ammonia oxidizers: from the first discoveries to today. *Journal of Microbiology*, 2014, 52(7): 537–547.
- [13] Erguder TH, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(5): 855–869.
- [14] Ouyang Y, Li XY. Impacts of drying-wetting cycles on CO₂ and N₂O emissions from soils in different ecosystems. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(4): 1251–1259. (in Chinese)
欧阳扬, 李叙勇. 干湿交替频率对不同土壤CO₂和N₂O释放的影响. *生态学报*, 2013, 33(4): 1251–1259.
- [15] Liu RX, He JZ, Zhang LM. Response of nitrification/denitrification and their associated microbes to soil moisture change in paddy soil. *Environmental Science*, 2014, 35(11): 4275–4283. (in Chinese)
刘若萱, 贺纪正, 张丽梅. 稻田土壤不同水分条件下硝化/反硝化作用及其功能微生物的变化特征. *环境科学*, 2014, 35(11): 4275–4283.
- [16] Liu YL, Zhang B, Hu F, Qiao J, Zhang WJ. Carbon and nitrogen mineralization of paddy soils as affected by wetting and drying. *Soils*, 2008, 40(4): 554–560. (in Chinese)
刘艳丽, 张斌, 胡锋, 乔洁, 张卫健. 干湿交替对水稻土碳氮矿化的影响. *土壤*, 2008, 40(4): 554–560.
- [17] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(41): 14683–14688.
- [18] Kemnitz D, Kolb S, Conrad R. High abundance of *Crenarchaeota* in a temperate acidic forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 60(3): 442–448.
- [19] Tourna M, Freitag TE, Nicol GW, Prosser JI. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(5): 1357–1364.
- [20] Chen XP, Zhu YG, Xia Y, Shen JP, He JZ. Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil?. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(8): 1978–1987.
- [21] Xia WW, Jia ZJ. Comparative analysis of soil microbial communities by pyrosequencing and DGGE. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(12): 1489–1499. (in Chinese)
夏围围, 贾仲君. 高通量测序和DGGE分析土壤微生物群落的技术评价. *微生物学报*, 2014, 54(12): 1489–1499.
- [22] He JZ, Zhang LM. Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(1): 406–415.
贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展. *生态学报*, 2009, 29(1): 406–415.
- [23] Prosser JI, Nicol GW. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends in Microbiology*, 2012, 20(11): 523–531.
- [24] Zhang Y, Yan BX. Research on influence of ditch sediments

- purifying nitrogen from water under drying and wetting conditions. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2011, 25(3): 113–116. (in Chinese)
张燕, 阎百兴. 干湿条件对沟渠沉积物净化水体氮素的影响研究. *水土保持学报*, 2011, 25(3): 113–116.
- [25] Zhang W, Zhang XD, He HB, Xie HT, Bai Z. Research advances in soil nitrogen transformation as related to drying/wetting cycles. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(4): 783–789. (in Chinese)
张威, 张旭东, 何红波, 解宏图, 白震. 干湿交替条件下土壤氮素转化及其影响研究进展. *生态学杂志*, 2010, 29(4): 783–789.
- [26] Pamplona FC, Paes ET, Nepomuceno A. Nutrient fluctuations in the Quatipuru river: a macrotidal estuarine mangrove system in the Brazilian Amazonian basin. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2013, 133: 273–284.
- [27] Lennon JT, Jones SE. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(2): 119–130.
- [28] Placella SA, Brodie EL, Firestone MK. Rainfall-induced carbon dioxide pulses result from sequential resuscitation of phylogenetically clustered microbial groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(27): 10931–10936.
- [29] Zhou X, Huang R, Song G, Pan XZ, Jia ZJ. Restoration of microbial ammonia oxidizers in air-dried forest soils upon wetting. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(11): 1311–1322. (in Chinese)
周雪, 黄蓉, 宋歌, 潘贤章, 贾仲君. 风干土壤中氨氧化微生物的恢复. *微生物学报*, 2014, 54(11): 1311–1322.
- [30] Alam MS, Ren GD, Lu L, Zheng Y, Peng XH, Jia ZJ. Conversion of upland to paddy field specifically alters the community structure of archaeal ammonia oxidizers in an acid soil. *Biogeosciences*, 2013, 10(8): 5739–5753.
- [31] Xia WW, Zhang CX, Zeng XW, Feng YZ, Weng JH, Lin XG, Zhu JG, Xiong ZQ, Xu J, Cai ZC, Jia ZJ. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. *International Society for Microbial Ecology*, 2011, 5(7): 1226–1236.
- [32] Lehtovirta-Morley LE, Stoecker K, Vilcinskas A, Prosser JI, Nicol GW. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(38): 15892–15897.
- [33] Lu L, Jia ZJ. Urease gene-containing *Archaea* dominate autotrophic ammonia oxidation in two acid soils. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(6): 1795–1809.
- [34] 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. *International Society for Microbial Ecology*, 2012, 6(5): 1032–1045.
- [35] Jia ZJ, Conrad R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1658–1671.
- [36] Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442(7104): 806–809.
- [37] Zhao J, Wang BZ, Jia ZJ. Phylogenetically distinct phylotypes modulate nitrification in a paddy soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(9): 3218–3227.
- [38] Wang BZ, Zhao J, Guo ZY, Ma J, Xu H, Jia ZJ. Differential contributions of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers to nitrification in four paddy soils. *The ISME Journal*, 2015, 9(5): 1062–1075.

Impact of periodical flooding-drying on nitrification and ammonia oxidizers in hydro-fluctuation belt of the Three Gorges Reservoir

Jia Guo¹, Xianjun Jiang^{1*}, Xue Zhou², Yao Meng¹, Zhongjun Jia²

¹ College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

² State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] This study was aimed to elucidate the effect of periodic flooding-drying to ecological processes of ammonia oxidizers in the hydro-fluctuation belt of the Three Gorges Reservoir. [Methods] Soil samples were collected at three altitudes in regions of Wanzhou, Fengdu and Changshou, representing 8, 5 and 0 times flooding-drying management, respectively. Soil physiochemical properties were analyzed and microcosms were constructed to monitor nitrification activity by fertilizing soils with ammonium substrate. Real-time PCR was used to quantify the population size of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB). DGGE fingerprints and clone libraries were conducted to study the shift of AOA and AOB compositions in nitrifying soils. [Results] Among the physiochemical characteristics of the soils, soil organic matter and total phosphates increased along with cycle increasing. After incubation for 13 days, the net nitrification rates of the samples with 8 cycles exceeded those with 5 cycles. The quantities of both AOA and AOB have increased during the incubation. Phylogenetic analysis showed that AOA were placed within the soil group 1.1b and soil group 1.1a, while bacterial ammonia oxidizers were closely related to *Nitrosospira* and Cluster 0. [Conclusion] Periodical flooding-drying increased soil organic matter, enhanced soil nitrification activity and likely played important roles in shaping community structures of soil ammonia oxidizers.

Keywords: Three Gorges Reservoir, periodic flooding-drying, nitrification, ammonia-oxidizing archaea, ammonia-oxidizing bacteria

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41271267)

*Corresponding author. E-mail: jiangxj@swu.edu.cn

Received: 8 September 2015; Revised: 6 December 2015; Published online: 24 December 2015