



典型岩溶槽谷区氨氧化微生物丰度对隧道建设的响应——以中梁山为例

陈畅¹, 贾亚男^{1*}, 贺秋芳^{1,2}, 蒋勇军¹, 叶凯¹, 王业荣¹

¹ 西南大学地理科学学院, 岩溶环境重庆市重点实验室, 重庆 400715

² 中国地质科学院岩溶地质研究所, 自然资源部广西岩溶动力学重点实验室, 广西 桂林 541004

陈畅, 贾亚男, 贺秋芳, 蒋勇军, 叶凯, 王业荣. 典型岩溶槽谷区氨氧化微生物丰度对隧道建设的响应——以中梁山为例. 微生物学报, 2022, 62(1): 119–130.

Chen Chang, Jia Yanan, He Qiufang, Jiang Yongjun, Ye Kai, Wang Yerong. Responses of the ammonia-oxidizing microorganisms' abundance to tunnel evacuation in karst trough valley: a case study in Zhongliang Mountain, Chongqing, China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 119–130.

摘要: 氨氧化微生物介导土壤中铵态氮的氧化, 是土壤硝化作用的第一步。【目的】在大型隧道工程影响的岩溶区, 了解氨氧化微生物对土壤含水率和营养环境变化的响应对于研究隧道建设引起的生态环境改变和氮循环过程变化都有十分重要的意义。【方法】本研究以重庆市北碚区中梁山龙凤槽谷为例, 对比受隧道影响的龙凤槽谷和不受隧道影响的龙车槽谷中 4 种土地利用方式(荒草地、竹林地、混交林以及菜园地)下的土壤中, 3 种氨氧化微生物(氨氧化细菌 AOB、氨氧化古菌 AOA、亚硝酸盐氧化细菌 CMX)的丰度变化, 结合土壤含水量、pH 以及土壤营养元素等的变化, 分析隧道建设引起的可培养氨氧化微生物数量变化及其过程机理。【结果】结果发现: ① 由于隧道开挖揭露了地下含水层, 导致地下水位下降、土壤含水率降低、pH 值升高、硝态氮含量增加、隧道影响区 AOA、AOB 和 CMX 丰度显著低于非隧道影响区, 后者数量分别是前者的 4.8、4.4 和 3.9 倍; ② 受岩溶区碱性土壤环境和地下水以及可溶物极易漏失的影响, 铵态氮等底物浓度并不是氨氧化细菌的主要影响因素, AOA 丰度与土壤含水率和土壤酸碱缓冲性能呈正相关($P<0.01$), CMX 和 AOB 丰度都与土壤硝态氮含量呈极其显著的负相关($P<0.05$), AOB 丰度还与土壤的 pH 值呈负相关($P<0.05$)。【结论】本研究揭示了岩溶区土壤理化性质中的含水率和 pH 是

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC0502306); 广西岩溶动力学重大科技创新基地开放课题(KDL & Guangxi 202007) Supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFC0502306) and by the Open Project of Guangxi Karst Dynamics Major Science and Technology Innovation Base (KDL & Guangxi 202007)

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

Received: 9 March 2021; Revised: 24 May 2021; Published online: 4 June 2021

影响3种氨氧化微生物丰度的主要因子, 隧道建设引起的地下水漏失和土壤有效水分降低是引起氨氧化微生物含量下降的主要原因, 一定程度上改变了隧道建设影响区的硝化过程, 但影响程度和更多微生物参与的氮循环过程改变还需要进一步详细的研究。

关键词: 岩溶槽谷区; 隧道建设; 氨氧化微生物; 氨氧化作用

Responses of the ammonia-oxidizing microorganisms' abundance to tunnel evacuation in karst trough valley: a case study in Zhongliang Mountain, Chongqing, China

CHEN Chang¹, JIA Yanan^{1*}, HE Qiufang^{1,2}, JIANG Yongjun¹, YE Kai¹, WANG Yerong¹

¹ Chongqing Key Laboratory of Karst Environment, School of Geographical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

² Key Laboratory of Karst Dynamics, Ministry of Natural Resources/Guangxi Zhuang Autonomous Region, Institute of Karst Geology, Chinese Academy of Geological Sciences, Guilin 541004, Guangxi, China

Abstract: Ammonia oxidizing microorganisms mediate the oxidation of ammonium nitrogen in the soil, which is the first step of nitrification. **[Objective]** In the karst areas affected by large tunnel projects, understanding the response of ammonia oxidizing microorganisms to changes in soil moisture and nutrient condition has great significance for researching the changes of the ecological environment and the nitrogen cycle process caused by tunnel construction. **[Methods]** This study took four land uses (Grass land; bamboo land; mixed forest; vegetable land) of Longfeng trough valley, which is tunnel-affected-area and the Longche trough valley, which is non-tunnel-affected-area in Zhongliang Mountain, Beibei, Chongqing as an example, comparing the abundance of three ammonia oxidizing microorganisms (Ammonia oxidizing bacteria AOB, ammonia oxidizing archaea AOA, nitrite oxidizing bacteria CMX) and combining with the changes of soil water content, pH, and soil nutrient elements, to analyze the changes of ammonia oxidizing microorganisms caused by tunnel construction and its process mechanism. **[Results]** The results shows: ① As the tunnel excavation exposed the underground aquifer, the level of groundwater decreased, the soil moisture content decreased, the pH and the nitrate nitrogen increased. The abundances of AOA, AOB and CMX of the tunnel-affected-area were significantly lower than the non-tunnel-affected zone, the abundances of the latter is 4.8, 4.4 and 3.9 times of the former respectively; ② Affected by the alkaline environment in soil and groundwater of karst area, as well as the vulnerability to leaking of solubles extremely easily, the concentration of substrates such as ammonium nitrogen is not the main influencing factors of ammonia oxidation microorganisms, the abundance of AOA is positively correlated with soil moisture content and soil buffering capacity ($P<0.01$), the abundances of CMX and AOB are both negatively correlated with soil nitrate nitrogen content ($P<0.05$), AOB abundance is also negatively correlated with soil pH ($P<0.05$). **[Conclusion]** This study reveals that soil physical and chemical properties like the soil moisture content and pH in karst areas are the main factors affecting the abundance of three ammonia oxidizing microorganisms. The leakage of groundwater and the decrease of soil effective moisture caused by tunnel construction are responsible for the decrease of ammonia oxidizing microorganisms abundances, which also change the

nitrification process in tunnel-affected-area to some extent. However, the degree of influence and the changes of nitrogen cycle which more microorganisms involve in need to be further studied in detail.

Keywords: karst trough valley; tunnel construction; ammonia-oxidizing microorganisms; ammonia oxidation

硝化作用普遍存在于各种生态系统中,是连接固氮作用与反硝化作用的中间环节^[1],不仅决定着植物对氮素的有效利用程度,并与过量氮肥投入导致的土壤酸化、硝酸盐淋失及其引起的水体污染和温室气体氧化亚氮(N_2O)释放等造成一系列生态环境问题密切相关^[2]。由于人类的大型工程活动,土壤生态系统正在发生重大变化。微生物驱动土壤氮循环的大部分环节,从而在大气、植物和土壤之间的N交换中发挥中心作用^[3]。因此了解土壤氮循环相关微生物对人类活动响应的过程、强度和机理,对维持土壤生态系统稳定,恢复退化的脆弱生态系统十分关键。中国西南岩溶槽谷区总面积21 323.7 km²,分布于西南八省的高山峻岭中^[4]。由于岩溶区特有的双层水网结构和脆弱的土壤系统,受到人类活动干扰的西南岩溶槽谷区极易生态退化发生石漠化^[5],大型隧道工程的贯通就是一种影响十分巨大的人类干扰活动。隧道工程贯通后,上覆岩溶槽谷区地下水文流场发生改变,土壤有效含水量、营养元素以及植被等生态系统各方面发生不同程度的退化,土壤微生物也不例外^[6]。但是,目前对于岩溶区大型工程影响下,环境因子的改变带来的氨氧化微生物的响应研究较少见诸报道。

由氨氧化微生物驱动的氨氧化作用是硝化作用的第一步,控制着硝化作用的速率,是全球氮循环的中心环节^[7]。探讨岩溶环境中氨氧化微生物在氮循环中的作用,对于了解岩溶区土壤三氮的转化机制以及指导农业生产生活都具有重要意义。氨氧化作用过去认为先由氨氧

化细菌(ammonia oxidation bacteria, AOB)和氨氧化古菌(ammonia oxidation archaea, AOA)氧化氨为亚硝态氮,再通过亚硝酸氧化细菌(nitrite oxidation bacteria, NOB)将亚硝态氮转化为硝态氮的两个过程,从而完成整个硝化作用^[8]。近几年的研究表明,NOB中*Nitrospira*属的一些成员(*comammox Nitrospira*, CMX)广泛分布于陆地生态系统在内的不同生境类型中,能够驱动完全氨氧化作用(complete ammonia oxidation; comammox),直接把硝态氮转化为铵态氮^[9-10]。土壤中氨氧化微生物受到基质浓度^[11-12]、pH^[13]、含水率^[6,14]、施肥量^[15-16]等不同环境因子的影响^[17]。在中性和石灰性土壤中,氨氧化作用主要由AOB驱动;而在酸性土壤中的氨氧化作用则以AOA为主导^[18]。另外,所有已知的AOB具有相对较低的底物亲和力,而AOA包含具有广泛底物亲和力的成员^[19]。对岩溶环境中氨氧化微生物的研究表明,多种环境因子对氨氧化微生物的丰度具有较为显著的影响,李强等发现地貌部位和土壤成因影响AOA丰度,真菌数量与AOB丰度呈显著正相关^[20],侯雪燕认为土壤pH显著影响土壤中氨氧化微生物的种类^[21]。与此同时,关于隧道建设引起的生态环境变化相关研究表明,隧道建设导致的地下水排泄引起上覆地区地下水水文流场和地下水循环过程发生改变^[22-24],从而引起土壤含水率下降、pH升高、营养元素降低等理化性质发生改变^[25-26],进而改变土壤微生物的群落结构和上覆植被^[6,27]。已有的研究发现,隧道建设影响区土壤中细菌多样性降低,氮循环相关细菌

Nitrospira 是发生改变的主要种属之一^[6], 但针对该地区氨氧化微生物的种类和数量变化研究尚未见报道。

重庆中梁山岩溶槽谷位于川东平行岭谷区, 区内岩溶地貌发育, 地表水漏失本就较为严重, 土壤持水性差。近年来, 由于城市化进程加快, 中梁山下部多条大型隧道贯通沟通重庆主城和西北部区县。工程建设给隧道沿线土部的土壤结构和质地、土壤肥力条件和生物多样性等带来诸多负面影响, 土壤含水率的减少尤为显著^[28-29]。已经表明, 隧道建设造成的地下水漏失, 引起了整体微生物群落结构的改变^[6]。本文选择中梁山岩溶槽谷中受隧道和不受隧道影响的两个独立水文单元区域采集土样, 分析 AOB、AOA 和 CMX 3 种微生物数量以及土壤环境因子变化, 采用相关分析和主成分分析的方法, 探究岩溶地区隧道建设对氨氧化微生物丰度的影响及其影响因子, 了解大型工程和人类活动带来的相关土壤环境因子和土壤氨氧化微生物的变化, 为微生物驱动的岩溶区氮循环过程提供基础数据, 并为将来治理大型工程带来的负面生态影响提供理论支持。

1 研究区概况

研究区(图 1)位于重庆市主城区西部中梁山的槽谷区 (106°18'14"–106°56'53"E, 29°39'10"–30°03'53"N), 海拔在 400–800 m。属于典型的中亚热带季风性湿润气候, 水热条件好, 年均气温 18 °C, 年均降水量 1 000 mm。本研究区发脉于华蓥山, 为长江、嘉陵江所深切, 形成典型的“一山三岭两槽”地貌。主要发育地带性黄壤和非地带性石灰土, 土壤发育的地质背景是三叠纪嘉陵江组的岩溶角粒状白云质灰岩。土壤通气性和透水性较差, 水土易流失, 为典型的岩溶石漠化地区。因地形的限制,

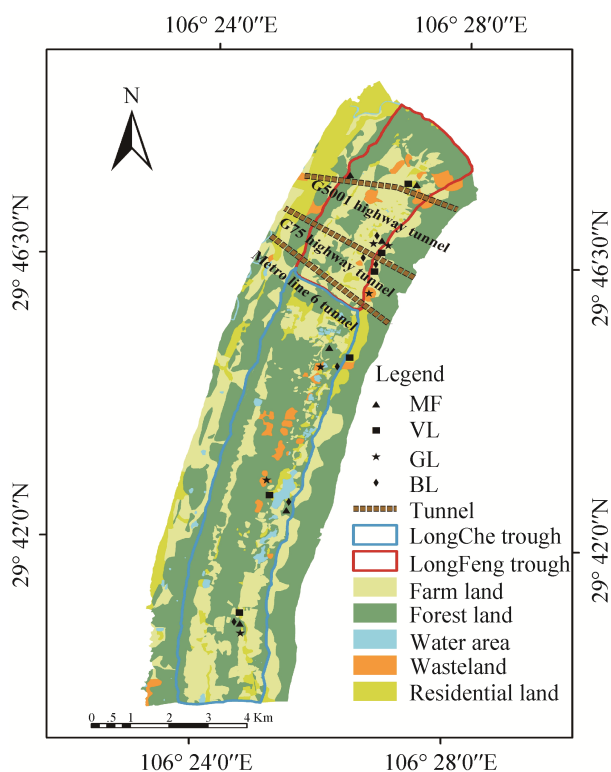


图 1 岩溶槽谷区土地利用和采样点分布图(改编自王正雄^[4], 2019)

Figure 1 Distribution map of land use and sampling points in karst trough area (modified from Zhengxiong Wang^[4], 2019).

农业耕作区分布在槽谷底部和山脚地区; 荒地分布在槽谷两侧山腰; 林地主要分布在山腰海拔较高地段, 少量分布于槽谷底部。土壤营养元素不平衡, 生态系统对外界环境变化较敏感, 自我恢复能力弱。

如图 1 所示, 中梁山槽谷分为龙凤槽谷(上部红色框线区)和龙车槽谷(下部蓝色框线区)两部分, 分属两个独立水文单元。龙凤槽谷区属于隧道影响区, 其下部中梁山山体有 3 条东西走向的大型隧道贯穿, 分别是重庆市轨道交通 6 号线中梁山隧道、G75 渝武高速北碚隧道、G5001 绕城高速施家梁隧道。由于隧道开挖不可避免地会破坏某些地下水的储存点和转移通

道,造成地下水的重新分配,因此破坏当地地下水环境和生态环境,从而影响土壤理化性质和对环境及其敏感的土壤微生物的变化。而与之形成对照的龙车槽谷区位于龙凤槽谷区的南部,北起龙头寺南至中梁镇,属于无隧道影响区。

2 材料与方法

2.1 样品采集

龙凤槽谷和龙车槽谷分别选取荒草地、混交林、竹林地和菜园地(后文分别标记为 GL、MF、BL、VL)各 3 个,共确定 24 个采样样地。采样点位于中梁山槽谷底部的嘉陵江组地层,相同土地利用方式的不同样地之间,直线距离保持 1 km 以上。样品采集时间为 2019 年 7 月,所有样品采集时间不超过 2 d。按照土壤不同发育程度,采用梅花 5 点法收集各个样点 0–20 cm 和 20–40 cm 的土层原状土(长×宽×高=15 cm×10 cm×20 cm)。将同一样方同一深度的土壤样品充分混合,从中取出 1 kg 样品,立即装入采样袋中,共采集 48 份土壤样品。其中隧道影响地区 24 份,不受隧道影响地区 24 份。将采集的土样密封并立即放进便携式避光箱中,用于测试土壤含水率、硝态氮、亚硝态氮以及铵态氮含量(带回实验室后 24 h 内测定)。每样品采集土样 2 份,剔除植物根系和碎片等杂质后储藏在冰箱(4 °C)中用于测定土壤氨氧化微生物的数量;另一份土样放置在通风阴凉的地方自然风干,风干后玛瑙研钵中磨碎、过 2 mm 筛以备测定土壤其余理化性质。

2.2 土壤基本理化性质的测定

①土壤 pH 值: pH 计电位法;②土壤含水率(后文标记为 MC): 烘干测定法;③土壤硝态氮含量: Griess-Ilosvay 法^[30];④土壤铵态氮含量: 纳氏试剂比色法^[30];⑤土壤亚硝态氮含量: ICS1100/1600 离子色谱仪测定法。

2.3 酸碱缓冲容量的测定

取 11 只 50 mL 的玻璃烧杯,依次编号,每烧杯中称取土样 4.0 g,在 1–5 号烧杯中分别加入 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mL 已配置的 HCl 溶液(0.1 mol/L),在 6–11 号烧杯中分别加入 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mL 等浓度的 NaOH 溶液(0.1 mol/L),6 号烧杯中不加酸碱,加入无 CO₂ 蒸馏水使各烧杯中总体积达 20 mL,摇匀,将土壤悬浊液在 25 °C 恒温条件下振荡 24 h,恒温培养 6 d(足以使 pH 值达到稳定状态),期间每天振荡 30 min,最后一次摇动后静止 2 h,测定 pH 值。以 pH 值为纵坐标,加入酸碱的量为横坐标作土壤缓冲曲线图。参照张永春等^[31]的研究方法,对酸碱缓冲曲线线性部分进行拟合分析(公式 1)。

$$\text{pHBC} = [(5-b)/a] - [(6-b)/a] \quad \text{公式(1)}$$

式中 pHBC 为土壤酸缓冲容量(后文标记为 BC); b 为截距; a 为斜率。

2.4 氨氧化微生物数量测定

土壤硝化作用微生物的数量采用梯度稀释平板菌落计数法测定。氨氧化细菌、氨氧化古菌以及 *Nitrospira* 菌落的培养基分别参照胡君利^[32]、Ushiki 等^[33]以及 Jung 等^[34]的富集培养方法,计算结果以每克干土中的菌落数(CFU/g)表示。

2.5 数据分析

部分拟合土壤酸碱缓冲曲线进行多元线性分析(REG)计算土壤酸碱缓冲容量。对土壤理化性质和氨氧化作用相关微生物的数量进行单因素方差分析(ANOVA)、皮尔逊相关分析以及主成分分析(PCA)。数据处理采用 Excel 2010 及 SPSS 22.0 软件。

3 结果与分析

3.1 土壤理化性质

由表 1 可知,隧道影响区土壤样品的含水率、BC 显著低于无隧道影响区($P < 0.01$),pH 值与硝

表 1 隧道影响区和非隧道影响区土壤的基本理化性质

Table 1 Basic physical and chemical properties of soils in tunnel-affected and non-tunnel-affected areas

Land use	Soil depth/cm	MC**/%		pH**		BC/(mmol/kg)		NO ₃ -N*/(mL/g)		NH ₃ -N/(mL/g)		NO ₂ -N/(mL/g)	
		S	FS	S	FS	S	FS	S	FS	S	FS	S	FS
GL	0–20	21.0	25.9	7.79	7.13	18.18	20.83	31.83	17.56	27.28	8.69	0.28	0.54
	20–40	21.7	23.9	7.75	7.19	16.95	18.18	18.36	11.62	22.00	9.01	0.28	0.61
BL	0–20	19.3	22.2	7.01	6.76	14.93	20.41	36.19	21.71	13.40	34.71	0.57	0.57
	20–40	15.6	19.2	7.24	6.79	13.16	17.86	22.28	7.11	8.18	15.82	0.77	0.59
MF	0–20	22.9	26.0	7.76	7.20	19.23	22.22	47.58	25.04	10.26	20.28	0.74	0.62
	20–40	23.2	24.8	8.05	7.28	18.52	18.87	23.06	19.50	8.88	16.14	0.73	0.62
VL	0–20	20.8	23.5	7.27	6.85	13.16	18.52	42.37	39.92	15.52	12.73	0.62	0.59
	20–40	20.9	22.0	7.21	6.84	13.70	15.63	31.59	27.37	16.28	6.74	0.88	0.62

“*” indicates a significance level at 0.05, “**” indicates a significance level at 0.01. GL: grass land; BL: bamboo land; MF: mixed forest; VL: vegetable land; S: tunnel-affected area; FS: non-tunnel-affected area.

态氮均高于无隧道影响区($P<0.05$), 荒草地和竹林地铵态氮含量高于非隧道影响区, 混交林和菜园地则相反, 两者的亚硝态氮含量无显著差异。

3.2 氨氧化微生物丰度特征

隧道影响区和无隧道影响区的土样中氨氧化作用相关微生物存在显著差异(图 2), AOA($P<0.05$)、AOB($P<0.05$)以及 CMX($P<0.01$) 3 种微生物的数量都是隧道影响区显著低于无隧道影响区。微生物数量的均值相差最大的是 AOB, 隧道影响区 AOB 的平均数量只有 6.12×10^7 CFU/g, 而无隧道影响区 AOB 的平均数量高达 $2.94\times$

10^8 CFU/g, 后者数量为前者的 4.8 倍。其次是 AOA 和 CMX, 分别是 4.4 倍和 3.9 倍。隧道影响区的土样中, 不同土地利用方式影响下 3 种微生物的数量相差不大。

在无隧道影响区的土样中, AOA 在混交林中含量最高, CMX 在菜园地中含量最高, AOB 在荒草地中含量最高。总的来说, 非隧道影响区 AOB>CMX>AOA, 可能是因为 AOA 对环境梯度不敏感以及生长较为缓慢。研究资料证明, 土地利用方式、环境条件等因素的差异, 尤其是氮素方面的差异导致氨氧化作用相关微生物数量的显著差异。

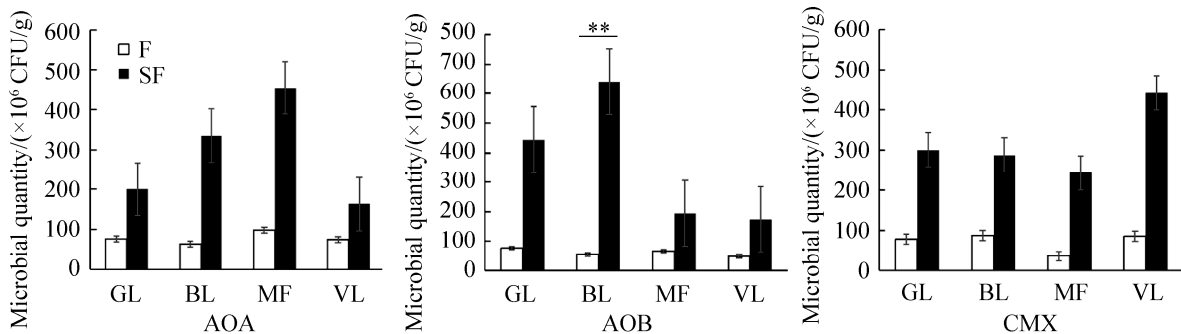


图 2 隧道区影响区和无隧道影响区不同土地利用方式下 3 种氨氧化微生物的丰度

Figure 2 Abundance of three ammonia-oxidizing microorganisms under different land use patterns in tunnel-affected area and no-tunnel-affected area. “*” indicates a significance level at 0.05, “**” indicates a significance level at 0.01. GL: grass land; BL: bamboo land; MF: mixed forest; VL: vegetable land; S: tunnel-affected area; FS: non-tunnel-affected area.

3.3 土壤理化性质及其与氨氧化微生物丰度的相关性分析

为进一步探究氨氧化微生物的丰度与土壤理化性质的关系, 对与其相关的土壤理化因子之间进行主成分分析, 以筛选产生影响的主要因子群。根据主成分分析原理中特征值的原则提取出 3 个主成分, 这 3 个综合指标即可代表氨氧化微生物丰度中的变异信息。由图 3 可知氨氧化微生物丰度的第一主成分主要综合了 pH、含水率和亚硝态氮的变异信息; 第二主成分主要综合了不同土地利用方式下 3 种氮素含量的变异信息, 并且隧道影响区和非隧道影响区分区明显。综合来看对氨氧化微生物丰度起主要作用的因子是主成分中的第一主因子, 也就是土壤的含水率和 pH 变化。

根据相关分析, 3 种氨氧化微生物数量与土壤理化性质存在显著的相关关系(表 2)。AOA 丰度与土壤含水率和土壤酸碱缓冲性能呈显著正相关关系 ($R^2=0.532$, $P<0.05$; $R^2=0.694$, $P<0.01$); CMX 和 AOB 丰度都与土壤硝态氮含量呈显著的负相关关系 ($R^2=0.695$, $P<0.01$; $R^2=0.626$, $P<0.01$), 此外 AOB 丰度还与土壤的

pH 值保持负相关关系($R^2=0.539$, $P<0.05$)。

4 讨论

4.1 隧道建设对土壤含水率以及 pH 的影响

中梁山大型隧道的贯通影响了上覆岩溶槽谷区的地下水循环, 引起土壤含水率下降和 pH

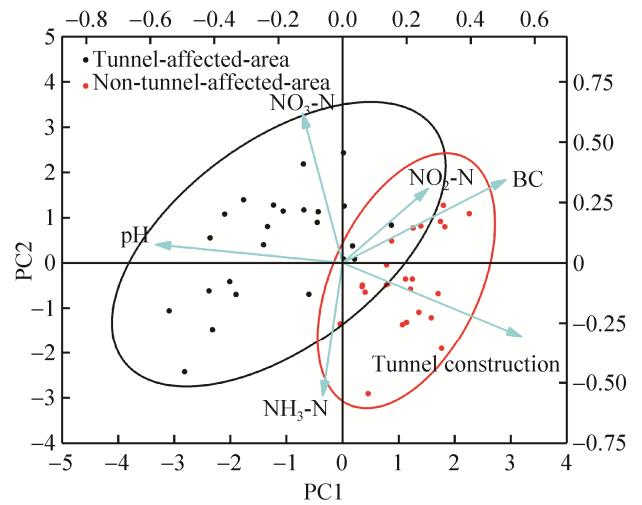


图 3 隧道影响区与非隧道影响区氨氧化微生物数量的主成分分析

Figure 3 Principal component analysis of ammonia-oxidizing microorganisms in tunnel-affected and non-tunnel-affected zones.

表 2 隧道影响区和非隧道影响区氨氧化微生物数量与土壤基本理化指标相关性

Table 2 Correlation between the number of ammonia-oxidizing microorganisms in tunnel-affected and non-tunnel-affected areas and soil basic physical and chemical indexes

Indexes	MC	pH	BC	NO ₃ -N	NH ₃ -N	NO ₂ -N	AOA	CMX	AOB
MC	1								
pH	0.084	1							
BC	0.766**	0.040	1						
NO ₃ -N	-0.059	0.183	-0.259	1					
NH ₃ -N	0.018	-0.037	0.283	-0.047	1				
NO ₂ -N	-0.116	-0.156	-0.267	0.177	-0.492	1			
AOA	0.532*	-0.355	0.694**	-0.291	0.457	-0.017	1		
CMX	0.305	-0.281	0.423	-0.695**	0.099	-0.050	0.571*	1	
AOB	0.221	-0.539*	0.485	-0.626**	0.237	-0.133	0.475	0.638**	1

“*” indicates a significance level at 0.05, “**” indicates a significance level at 0.01.

上升。中梁山岩溶槽谷区隧道开挖过程中,地下水向开挖隧道中排泄,隧道开通3年以后洞内涌水量已达到完全稳定,其日均排水量达到7 778.1 m³以上^[22]。粘土矿物浸泡后在水流的溶蚀以及冲击作用下被带走,使得颗粒间的点接触逐渐消失,大量的中小孔隙急剧增加,大量地下水以基岩孔隙水的形式流出,从而导致地下水大量疏干^[23]。同时研究区内地上和地下岩溶地貌十分发育,土壤透水性较差、水土易流失。当地下水位下降时,表层孔隙潜水在重力作用下下降到土层深处以补给地下水,从而减少了地表径流以及表层土壤水,因此导致了如表1所示的隧道影响区的含水率(均值)显著低于无隧道影响区(隧道影响区20%<无隧道影响区23%)。土壤水分是土壤中养分迁移的载体,其波动变化将导致土壤pH、营养元素等因子的协同变化^[35]。干旱土壤中,土壤含水率的降低引起土壤酸碱度的升高^[6]。中梁山隧道影响区地表径流和表层泉水干涸,因而引发表层土壤水分减少、酸碱度降低、土壤肥力下降等一系列生态环境变化。相对于无隧道影响区,隧道影响区含水率较低,土壤中的水解酸溶出速率减缓,pH值显著高于隧道影响区($P<0.05$)。

由主成分分析可知,隧道影响区和非隧道影响区土壤基本理化性质如含水率和pH值等,是影响氨氧化丰度的第一主成分(特征值=2.354),并且两者在第一主成分坐标轴上分区显著。土壤含水率对微生物的生长发育起着不可替代的作用,隧道建设造成的水分减少、pH上升、有效养分流失等一系列环境问题给氨氧化微生物带来更大的生理压力。本研究中也发现,含水率较高和养分较充足的无隧道影响区中,3种氨氧化微生物丰度也更高,AOA、AOB和CMX含量显著高于受隧道影响地区(表1)。与此同时,受隧道影响地区在不同土地利用方

式下3种氨氧化细菌的丰度差异不大。进一步说明,受水分减少和pH升高的胁迫,3种氨氧化微生物的丰度均维持在极低的含量,人类活动引起的土壤氮丰度改变对氨氧化微生物的丰度影响相对较小。王家楠等^[6]对中梁山土壤微生物样品16S rDNA高通量测序研究表明,CMX细菌*Nitrospira*为隧道影响区与非隧道影响区含量最多的属之一,但隧道影响区*Nitrospira*丰度均值低于非隧道影响区,但这种差异并不显著。本研究对不同土地利用方式下可培养氨氧化细菌的丰度对比发现,除菜地外,林地、草地和混交林中隧道影响区CMX都存在显著的降低,而混交林中AOA和竹林地中AOB也存在显著降低。由此可见,可培养氨氧化微生物的变化有所不同,但其具体的机制和种群结构变化的差异还需要进一步研究。将来的研究中,可以运用特异性引物结合高通量测序进一步分析*amoA*基因的丰度变化,以及进一步分析AOA、AOB和CMX的变化,进而更精确地了解隧道建设影响下的氨氧化微生物变化和氮循环过程的机理。

4.2 隧道建设引起的土壤氮素变化以及氨氧化微生物丰度的响应

氨氧化微生物利用铵态氮作为底物,AOA、AOB驱动铵态氮转化为亚硝态氮再进一步氧化成为硝态氮,而CMX能够驱动完全氨氧化作用,直接将铵态氮转化为硝态氮^[9-10]。理论上,3种氨氧化细菌都受铵态氮含量的影响,铵态氮的含量决定3种细菌的生长状态,而硝态氮作为氨氧化的产物,氨氧化作用越强,其含量越高。但是本研究中发现,铵态氮与3种氨氧化微生物的丰度都没有显著的相关关系,而硝态氮含量与AOB、CMX呈显著负相关关系,这与前人研究结论有所不同^[11,36-37],说明岩溶区特殊

的水文地质环境影响了微生物与营养元素之间的协同关系。

铵态氮对土壤酸碱度的反应敏感^[38], 在酸性环境下, 当土壤含水率升高, pH 值降低, H^+ 释放量增加, 几乎所有的氨被质子化, 存在形式以 NH_4^+ 为主, 氨挥发量极少^[39]; 而在岩溶区, 由于弱碱性环境的存在, 土壤水溶液中的铵态氮很不稳定。根据 Ulrich^[40] 土壤缓冲体系划分标准, 岩溶环境中的缓冲体系主要由碳酸钙等碳酸盐(缓冲范围 pH 8.6–6.2)构成, 同时隧道影响区由于含水量降低, 土壤中碳酸岩风化作用减弱, 土壤有机质含量较低, 岩溶区相对单一的缓冲体系对外界环境改变的敏感性较高, 对外源性酸碱的缓冲能力很有限^[41–42]。因而, 受人类活动干扰较少的混交林和竹林地, 土壤吸附和保存 NH_4^+ 的能力下降, 铵态氮平均含量(表 1, 9.57 mL/g 和 10.79 mL/g)显著低于无隧道影响区(18.21 mL/g 和 25.27 mL/g)。而在菜园地和荒草地(撂荒时间 1–2 年), 受人类活动的影响, 碳铵和尿素等氮肥的添加带来土地氮含量变化, 铵态氮并不遵循含水率的影响, 反而无隧道影响区含量更高。与此同时, 氨氧化微生物丰度还受到其他因素的影响, 如施肥量^[15–16], 并且两者并不是一直保持正相关的关系, 当土壤氮负荷过多时反而导致氨氧化微生物丰度的下降^[43]。因而, 在本研究中铵态氮与氨氧化细菌丰度之间的相关关系并不显著。土壤水分和可溶性盐类一起构成土壤溶液, 作为土壤微生物提供养分的媒介^[35], 因而隧道建设带来的土壤含水率减少影响土壤中营养元素的循环, 从而引起氮循环相关微生物丰度的降低。本研究中土壤含水率与土壤酸碱缓冲性($R^2=0.766$, $P<0.01$)和 AOA 丰度($R^2=0.532$, $P<0.05$)呈显著正相关关系。隧道建设引起的含水率降低, 土壤 pH 升高, 中和所需酸也随之增多, 同时含水率降低

带来了土壤有机质含量较低, 而岩溶区碳酸盐在酸碱缓冲体系中所占比例较大, 相对单一的缓冲体系对外界环境改变的敏感性较高, 从而引起土壤酸碱缓冲性能的联动变化^[44]。AOA 具有如寡营养生长等特点, 适应性和生长性较强^[19], 因而氮素含量的变化对 AOA 丰度的影响不大。与之相对的, 表明岩溶环境中土壤参数如低含水率、高 pH 和低酸碱缓冲性能等可能比氮素含量减少对降低氨氧化微生物整体丰度影响更大。

NO_3-N 在土壤中很少被土壤颗粒所吸附, 主要以溶质的形式存在于土壤溶液中^[45]。在非岩溶区, 土壤中硝态氮的含量随土壤深度增加而富集^[46]; 而在岩溶区, NO_3-N 易溶于水, 从而随地下水向下运移而向岩溶地区的裂隙和地下河转移, 土壤中硝态氮的含量呈现波动变化, 主要受季节性含水量变化的影响^[47–48]。土壤含水量降低带来土壤氧分压的升高, 土壤曝气增加有利于氨氧化细菌进行铵态氮的氧化, 从而引起土壤硝态氮的增加^[49]。但是, 由于无隧道影响区更易 NO_3-N 向下迁移, 因而, 无隧道影响区氨氧化细菌丰度更高, 产生的 NO_3-N 可能更多。硝态氮含量与 AOB、CMX 之间的显著负相关关系, 都是受到土壤含水率的控制, 而非土壤微生物与硝态氮含量之间的直接体现。

5 结论

本研究采集 4 种不同土地利用方式下土壤中可培养氨氧化微生物的丰度变化, 结合土壤理化性质变化, 分析隧道建设影响下氨氧化微生物丰度的变化及其影响因素, 结果如下所述。

(1) 受隧道建设影响, 中梁山隧道影响区 AOA、CMX 以及 AOB 3 种氨氧化微生物丰度显著低于非隧道影响区。

(2) 隧道开挖揭露了地下含水层,地下水位下降,土壤含水率降低,pH值升高,硝态氮含量增加。但是受岩溶区碱性土壤环境和地下水以及可溶物极易漏失的影响,铵态氮等底物浓度并不是氨氧化细菌的主要影响因素,土壤理化性质中的含水率和pH是影响3种氨氧化微生物丰度的主要因子。

本研究发现岩溶区隧道建设引起的土壤含水量降低,进一步导致了土壤氨氧化微生物丰度的降低。微生物丰度的变化可能带来土壤中氮循环过程的变化和土壤中营养元素的流失,为评估隧道建设引起的上覆地区生态环境的恶化提供了理论基础,但氮循环相关微生物的响应机制和变化细节还需要进一步更加细致的研究。

参考文献

- [1] Prosser JI. Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 1990, 30: 125–181.
- [2] 贺纪正, 张丽梅. 土壤氮素转化的关键微生物过程及机制. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 98–108.
He JZ, Zhang LM. Key processes and microbial mechanisms of soil nitrogen transformation. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 98–108. (in Chinese)
- [3] Graham EB, Knelman JE, Schindlbacher A, Siciliano S, Breulmann M, Yannarell A, Beman JM, Abell G, Philippot L, Prosser J, Foulquier A, Yuste JC, Glanville HC, Jones DL, Angel R, Salminen J, Newton RJ, Bürgmann H, Ingram LJ, Hamer U, Siljanen HMP, Peltoniemi K, Potthast K, Bañeras L, Hartmann M, Banerjee S, Yu RQ, Nogaro G, Richter A, Koranda M, Castle SC, Goberna M, Song B, Chatterjee A, Nunes OC, Lopes AR, Cao YP, Kaisermann A, Hallin S, Strickland MS, Garcia-Pausas J, Barba J, Kang H, Isobe K, Papaspyrou S, Pastorelli R, Lagomarsino A, Lindström ES, Basiliko N, Nemergut DR. Microbes as engines of ecosystem function: when does community structure enhance predictions of ecosystem processes? *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 214.
- [4] 王正雄, 蒋勇军, 张远喆, 段世辉, 刘九缠, 曾泽, 曾思博. 基于GIS与地理探测器的岩溶槽谷石漠化空间分布及驱动因素分析. *地理学报*, 2019, 74(5): 1025–1039.
- Wang ZX, Jiang YJ, Zhang YZ, Duan SH, Liu JC, Zeng Z, Zeng SB. Spatial distribution and driving factors of karst rocky desertification based on GIS and geodetectors. *Acta Geographica Sinica*, 2019, 74(5): 1025–1039. (in Chinese)
- [5] 曹建华. 受地质条件制约的中国西南岩溶生态系统. 北京: 地质出版社, 2005.
- [6] 王家楠, 蒋勇军, 贺秋芳, 范佳鑫, 何瑞亮, 吴超. 中梁山岩溶槽谷区荒草地土壤微生物群落对隧道建设的响应. *生态学报*, 2019, 39(16): 6136–6145.
Wang JN, Jiang YJ, He QF, Fan JX, He RL, Wu C. Response of soil microbial community in grassland to tunnel construction in the karst trough valley, Zhongliang Mountain, Chongqing. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, 39(16): 6136–6145. (in Chinese)
- [7] Vlaeminck SE, Hay AG, Maignien L, Verstraete W. In quest of the nitrogen oxidizing prokaryotes of the early Earth. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(2): 283–295.
- [8] Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, Jehmlich 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. *Nature*, 2015, 528(7583): 504–509.
- [9] Van Kessel MAHJ, Speth DR, Albertsen M, Nielsen PH, Op den Camp HJM, Kartal B, Jetten MSM, Lüscher S. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 2015, 528(7583): 555–559.
- [10] Chu HY, Fujii T, Morimoto S, Lin XG, Yagi K. Population size and specific nitrification potential of soil ammonia-oxidizing bacteria under long-term fertilizer management. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(7): 1960–1963.
- [11] Di HJ, Cameron KC, Shen JP, Winefield CS, O'Callaghan M, Bowatte S, He JZ. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. *Nature Geoscience*, 2009, 2(9): 621–624.
- [12] Yao HY, Gao YM, Nicol GW, Campbell CD, Prosser JI, Zhang LM, Han WY, Singh BK. Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(13): 4618–4625.
- [13] Nicol GW, Leininger S, Schleper C, Prosser JI. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 2966–2978.
- [14] 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.

- 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)
- [15] 王梅, 王智慧, 石孝均, 蒋先军. 长期不同施肥量对全程氨氧化细菌丰度的影响. *环境科学*, 2018, 39(10): 4727–4734.
Wang M, Wang ZH, Shi XJ, Jiang XJ. Long-term fertilization effects on the abundance of complete ammonia oxidizing bacteria (comammox *Nitrospira*) in a neutral paddy soil. *Environmental Science*, 2018, 39(10): 4727–4734. (in Chinese)
- [16] Leininger S, Urich T, Schlöter 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.
- [17] 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. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(12): 3152.
- [18] Vincenzi V, Gargini A, Goldscheider N. Using tracer tests and hydrological observations to evaluate effects of tunnel drainage on groundwater and surface waters in the Northern Apennines (Italy). *Hydrogeology Journal*, 2009, 17(1): 135–150.
- [19] S  neca J, Pjevac P, Canarini A, Herbold CW, Zioutis C, Dietrich M, Simon E, Prommer J, Bahn M, P  tsch EM, Wagner M, Wanek W, Richter A. Composition and activity of nitrifier communities in soil are unresponsive to elevated temperature and CO₂, but strongly affected by drought. *The ISME Journal*, 2020, 14(12): 3038–3053.
- [20] 李强, 靳振江, 李忠义, 罗堃, 唐志琴, 黄静云, 陆文体. 岩溶地貌部位对土壤微生物丰度与酶活性的影响. *水土保持通报*, 2014, 34(3): 50–54.
Li Q, Jin ZJ, Li ZY, Luo K, Tang ZQ, Huang JY, Lu WT. Effect of karst physiognomy on soil microbial abundance and enzyme activities. *Bulletin of Soil and Water Conservation*, 2014, 34(3): 50–54. (in Chinese)
- [21] 侯雪燕. 土壤 pH 对硝化作用和氨氧化微生物群落结构的影响. 西南大学学位论文, 2014.
- [22] 罗鉴银, 傅瓦利. 岩溶地区开凿隧道对地下水循环系统的破坏——以重庆市中梁山为例. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 27(4): 432–435.
Luo JY, Fu WL. Destruction caused by tunneling works to the circulatory system of underground water in karst areas—a case study of the Zhongliang mountains in Chongqing. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2005, 27(4): 432–435. (in Chinese)
- [23] 高程. 第三系软弱围岩地下水环境效应研究. 西南交通大学学位论文, 2013.
- [24] Zheng W, Wang XL, Tang Y, Liu H, Wang M, Zhang LJ. Use of tree rings as indicator for groundwater level drawdown caused by tunnel excavation in Zhongliang mountains, Chongqing, Southwest China. *Environmental Earth Sciences*, 2017, 76(15): 1–14.
- [25] 吕玉香, 蒋勇军, 王正雄, 胡伟. 西南岩溶槽谷区隧道建设的水文生态环境效应研究进展. *生态学报*, 2020, 40(6): 1851–1864.
L   YX, Jiang YJ, Wang ZX, Hu W. Review on the hydrology and the ecological and environmental effects of tunnel construction in the karst valley of Southwest China. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40(6): 1851–1864. (in Chinese)
- [26] 张远瞩, 蒋勇军, 李勇, 王正雄, 段世辉, 吴韦, 彭学义, 王冬. 隧道工程对喀斯特槽谷区坡面产流及土壤侵蚀的影响. *生态学报*, 2019, 39(16): 6126–6135.
Zhang YZ, Jiang YJ, Li Y, Wang ZX, Duan SH, Wu W, Peng XY, Wang D. Effects of tunnel excavation on slope runoff and soil erosion in a karst trough valley. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, 39(16): 6126–6135. (in Chinese)
- [27] 吴超, 蒋勇军, 沈立成, 刘九缠, 何瑞亮. 喀斯特槽谷典型植物水分利用效率对隧道建设的响应. *生态学报*, 2020, 40(12): 4032–4040.
Wu C, Jiang YJ, Shen LC, Liu JC, He RL. Response of water use efficiency of typical plants to tunnel construction in karst trough valley. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40(12): 4032–4040. (in Chinese)
- [28] Yoo C. Interaction between tunneling and groundwater—numerical investigation using three dimensional stress–pore pressure coupled analysis. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 2005, 131(2): 240–250.
- [29] Zhao Y, Li PF, Tian SM. Prevention and treatment technologies of railway tunnel water inrush and mud gushing in China. *Journal of Rock Mechanics and Geotechnical Engineering*, 2013, 5(6): 468–477.
- [30] 鲍士旦. 土壤农化分析. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [31] 张永春, 汪吉东, 沈明星, 沈其荣, 许仙菊, 宁运旺. 长期不同施肥对太湖地区典型土壤酸化的影响. *土壤学报*, 2010, 47(3): 465–472.

- Zhang YC, Wang JD, Shen MX, Shen QR, Xu XJ, Ning YW. Effects of long-term fertilization on soil acidification in Taihu lake region, China. *Acta Pedologica Sinica*, 2010, 47(3): 465–472. (in Chinese)
- [32] 胡君利, 林先贵, 褚海燕, 尹睿, 张华勇, 苑学霞, 朱建国. 土壤氨氧化细菌的分离方法研究. *土壤*, 2005, 37(5): 154–156.
- Hu JL, Lin XG, Chu HY, Yin R, Zhang HY, Yuan XX, Zhu JG. Isolation of soil ammonia-oxidizing bacteria. *Soils*, 2005, 37(5): 154–156. (in Chinese)
- [33] Ushiki N, Jinno M, Fujitani H, Suenaga T, Terada A, Tsuneda S. Nitrite oxidation kinetics of two *Nitrospira* strains: the quest for competition and ecological niche differentiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 123(5): 581–589.
- [34] Jung MY, Park SJ, Min D, Kim JS, Rijpstra WIC, Sininghe Damsté JS, Kim GJ, Madsen EL, Rhee SK. Enrichment and characterization of an autotrophic ammonia-oxidizing archaeon of mesophilic crenarchaeal group I.1a from an agricultural soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(24): 8635–8647.
- [35] 朱鹤健, 陈健飞, 陈松林. 土壤地理学. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2010.
- [36] Pratscher J, Dumont MG, Conrad R. Ammonia oxidation coupled to CO₂ fixation by archaea and bacteria in an agricultural soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(10): 4170–4175.
- [37] Jia ZJ, Conrad R. Bacteria rather than archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1658–1671.
- [38] 胡璐, 李心清, 黄代宽, 程建中. 中国北方-蒙古干旱半干旱区土壤铵态氮的分布及其环境控制因素. *地球化学*, 2008, 37(6): 572–580.
- Hu L, Li XQ, Huang DK, Cheng JZ. Ammonium nitrogen in surface soil of arid and semiarid Central East Asia. *Geochimica*, 2008, 37(6): 572–580. (in Chinese)
- [39] 袁巧霞, 朱端卫, 武雅娟. 温度、水分和施氮量对温室土壤 pH 及电导率的耦合作用. *应用生态学报*, 2009, 20(5): 1112–1117.
- Yuan QX, Zhu DW, Wu YJ. Coupling effects of temperature, moisture, and nitrogen application on greenhouse soil pH and EC. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(5): 1112–1117. (in Chinese)
- [40] Ulrich B. Natural and anthropogenic components of soil acidification. *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde*, 1986, 149(6): 702–717.
- [41] Bedrna Z. Resistibility of landscape to acidification. *kologia-Bratislava*, 1994, 13(1): 77–86.
- [42] Weaver AR, Kissel DE, Chen F, West LT, Adkins W, Rickman D, Luvalle JC. Mapping soil pH buffering capacity of selected fields in the coastal plain. *Soil Science Society of America Journal*, 2004, 68(2): 662–668.
- [43] Shen XY, Zhang LM, Shen JP, Li LH, Yuan CL, He JZ. Nitrogen loading levels affect abundance and composition of soil ammonia oxidizing prokaryotes in semiarid temperate grassland. *Journal of Soils and Sediments*, 2011, 11(7): 1243–1252.
- [44] 黄平, 张佳宝, 朱安宁, 张丛志. 黄淮海平原典型潮土的酸碱缓冲性能. *中国农业科学*, 2009, 42(7): 2392–2396.
- Huang P, Zhang JB, Zhu AN, Zhang CZ. Acid and alkaline buffering capacity of typical fluor-aquic soil in Huang-huai-hai plain. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(7): 2392–2396. (in Chinese)
- [45] De Boer W, Kowalchuk GA. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(7/8): 853–866.
- [46] 陈效民, 邓建才, 柯用春, 张佳宝, 朱安宁. 硝态氮垂直运移过程中的影响因素研究. *水土保持学报*, 2003, 17(2): 12–15.
- Chen XM, Deng JC, Ke YC, Zhang JB, Zhu AN. Study on influence factors in process of nitrate vertical transport. *Journal of Soil Water Conservation*, 2003, 17(2): 12–15. (in Chinese)
- [47] 贺秋芳. 青木关地下河岩溶系统中的氮循环及其相关微生物作用与示踪研究. 西南大学学位论文, 2009.
- [48] 汪智军, 杨平恒, 旷颖仑, 贺秋芳, 袁文昊, 袁道先. 基于 ¹⁵N 同位素示踪技术的地下河硝态氮来源时空变化特征分析. *环境科学*, 2009, 30(12): 3548–3554.
- Wang ZJ, Yang PH, Kuang YL, He QF, Yuan WH, Yuan DX. Temporal and spatial variations of the nitrate-nitrogen sources in an underground river using ¹⁵N isotope technique. *Environmental Science*, 2009, 30(12): 3548–3554. (in Chinese)
- [49] 黄绍敏, 皇甫湘荣, 宝德俊, 张鸿程, 孙克刚. 土壤中硝态氮含量的影响因素研究. *农业环境保护*, 2001, 20(5): 351–354.
- Huang SM, Huangfu XR, Bao DJ, Zhang HC, Sun KG. Factors affecting content of nitrate-nitrogen in soil. *Agro-Environmental Protection*, 2001, 20(5): 351–354. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)