

# 黑土区连作大豆根际土壤氨氧化古菌群落结构特征及其驱动因子分析

陈雪丽, 李伟群, 王英, 王玉峰, 王晓军

(黑龙江省农业科学院 土壤肥料与环境资源研究所/黑龙江省土壤环境与植物营养重点实验室/黑龙江省肥料工程技术研究中心, 黑龙江哈尔滨 150086)

**摘要:** 连作导致大豆根圈微环境中物质代谢过程发生变化, 其中土壤氮素转化相关的一些功能菌群落组成常用来表征土壤氮素转化能力对连作制度的响应。氨氧化是氮素转化过程中的第一步也是限速步骤, 通常氨氧化细菌和氨氧化古菌被认为是氨氧化过程的引擎。本文利用黑龙江省农业科学院土壤肥料与环境资源研究所的大豆长期连作试验田为研究平台, 采用 qPCR 和高通量测序等方法, 分析连作大豆根际氨氧化古菌的群落丰度和结构组成。结果表明: 连作 2 年和连作 17 年处理的氨氧化古菌丰度较其它处理低; 连作大豆根际氨氧化古菌种类来自泉古菌门(*Crenarchaeota*) 和奇古菌门两大类(*Thaumarchaeota*), 仍有 42% 为未分类的古菌种类。氨氧化古菌群落结构与环境因子相关关系分析结果表明: 轮作和连作 2 年大豆根际土壤氨氧化古菌群落结构组成与土壤总氮含量、总碳含量呈正相关关系而连作 4 年以上处理的氨氧化古菌群落结构组成与 pH 和碳氮比呈正相关关系。

**关键词:** 黑土; 大豆连作; 根际; 群落多样性; 氨氧化古菌

中图分类号: S154.3 文献标识码: A DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0620

## Characterization of Ammonia Oxidizing Archaea Community and Its Driving Factors in the Rhizosphere of Continuous Cropping Soybean in Black Soil

CHEN Xue-li, LI Wei-qun, WANG Ying, WANG Yu-feng, WANG Xiao-jun

(Institute of Soil Fertilizer and Environment Resources, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Soil Environment and Plant Nutrition of Heilongjiang Province/Fertilizer Engineering Technology Research Center of Heilongjiang Province, Harbin 150086, China)

**Abstract:** Continuous cropping resulted in the changing of metabolism process in the rhizosphere of soybean, while the community composition of nitrogen related functional genes were always used to evaluate the response of the nitrogen conversion capability of soil to continuous cropping system. Ammonia oxidizing was the first step in the course of nitrogen transformation and also the limited speed step, so that ammonia oxidizing bacteria (AOB) and ammonia oxidizing archaea were always considered the driver of the nitrogen transformation process. In this study, the methods of qPCR and Illumina Miseq sequencing were used to analyze the ammonia oxidizing archaea (AOA) community composition and quantities in rhizosphere of soybean based on the soybean continuous cropping located observation in black soil. The results showed that the abundance of Archaea *amoA* gene in SC2 and SC17 were lower than that in other treatments. AOA in the rhizosphere of soybean belongs to two phylums, *Crenarchaeota* and *Thaumarchaeota*, and still have unclassified AOA accounted for 42%. The correlated analysis between AOA composition and environment factors indicated that the AOA compositions of MS (maize-soybean rotation) and SC2 were positive related to the contents of total nitrogen and total carbon, then that of treatments with more than continuous cropping years of 4 showed positive related to pH and C/N ratio.

**Keywords:** Black soil; Soybean continuous cropping; Rhizosphere; Diversity of soil microorganism community; Ammonia oxidizing archaea

将铵氧化成亚硝酸盐的反应过程是农业和自然生态系统氮循环中关键步骤<sup>[1]</sup>, 近年来越来越多的研究表明, 氨氧化古菌在农田氨氧化过程中起到重要作用<sup>[2-4]</sup>。氨氧化古菌被认为更适于生长在极端环境条件下, 如酸土<sup>[5]</sup>, 高纬度土壤<sup>[6]</sup>和锌污染严重的土壤<sup>[7]</sup>。以往的研究表明, 红土上氨氧化细菌 *amoA* 基因与土壤潜在硝化速率呈显著正相关<sup>[3, 8]</sup>。黑土上, 有报道认为施肥种类和数量对氨氧化古菌的群落组成和丰度没有显著影响<sup>[9]</sup>, 然而

在相同的施肥条件下, 种植制度对氨氧化古菌群落结构组成的影响未见报道。

大豆生长需要的氮主要来自土壤中固氮菌的固氮作用和氨氧化微生物的亚硝化作用。Ruan等<sup>[10]</sup>研究表明大豆根瘤的数量随着大豆根际化感物质的积累显著降低, 这些化感物质来自作物茎秆和根系分泌, 作物根茬腐解以及土壤微生物代谢作用。从而导致连作条件下, 大豆根际固氮菌活性和繁殖受到抑制, 固氮效率降低<sup>[11]</sup>。同时, 范晓辉

收稿日期: 2015-11-27

基金项目: 国家自然科学基金(41301270); 黑龙江省人力资源和社会保障厅留学回国人员科技项目择优资助(2015); 哈尔滨市青年科技创新人才专项基金(2012RFQYN035); 哈尔滨市应用技术研究与开发项目(2014RFQYJ082)。

第一作者简介: 陈雪丽(1980-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事土壤微生物生态研究。E-mail: xuelichen99@163.com。

等<sup>[12]</sup>认为大豆自生固氮减少了对土壤中无机氮的吸收,最终导致大豆从土壤中吸收阳离子的总量超过了吸收阴离子的总量,从而引起大豆根际土壤酸化,造成大豆生长受阻,品质下降、产量降低,同时使连作大豆根际微环境改变<sup>[13-15]</sup>。Chen 等<sup>[16]</sup>研究表明,大豆连作 7 年氨氧化细菌 *amoA* 基因丰度较低,但是氨氧化细菌种类较为丰富;当大豆连作 17 年土壤中氨氧化细菌群落种类明显减少。基于以往的研究,本文在大豆长期连作试验观测站的基础上,定量分析氨氧化古菌在连作大豆根际土壤中的丰度,探讨在肥力较高的黑土上氨氧化古菌群是如何响应大豆长期连作,旨在通过调控土壤功能菌群群落组成,促进土壤生态系统的氮循环过程提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验区基本概况

试验区位于黑龙江省哈尔滨市民主乡的黑龙 江省农业科学院现代化农业创新园区内( N45°49′, E126°50′)。年降雨量 500 ~ 800 mm,4 ~ 9 月份的 降水占全年总降水量的 90% 左右,7 ~ 9 月份的降雨 量占全年总降水的一半以上,雨热同季有利于植物 生长。夏季炎热短暂,冬季严寒漫长,达 5 ~ 6 个月。 试验区地形较为平坦,试验开始于 1995 年,一年一 熟制,供试土壤为典型黑土,目前有包括轮作、连作 2 年到连作 17 年共 18 个处理。每年肥料施入量为 纯 N 45 kg · hm<sup>-2</sup>、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 90 kg · hm<sup>-2</sup>、K<sub>2</sub>O 45 kg · hm<sup>-2</sup>,所有肥料作底肥一次施入所用肥料为尿 素(含 N 量 46%)、磷肥为二铵(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 含量 18%)、钾 肥为氯化钾(K<sub>2</sub>O 含量 60%)。试验小区的田间管 理同一般大田。

### 1.2 试验设计

本研究于 2011 年 9 月,大豆收获期采用抖根法 收集连作 2 年(SC2)、连作 4 年(SC4)、连作 7 年 (SC7)、连作 11 年(SC11)、连作 17(SC17)和玉米 - 大豆轮作(MS)根际土壤,其中轮作处理作为对照, 每个处理 3 个小区重复。在每个小区中分别采集 5 个点大豆根际土壤,混匀,用冰盒保存带回实验室。 分装为两份土壤样品,一份保存在 4℃ 冰箱以备测 定土壤潜在硝化速率,另一份约 50 g 保存在 -80℃ 冰箱以备提取土壤总 DNA。同时采集非根际土壤 约 500 g,风干以备测定土壤化学指标。

### 1.3 方 法

1.3.1 土壤化学指标测定方法 土壤 pH 测定采 用振荡法(1:2.5,w/v),震荡 30 min,赛多利斯 pH 计(PB-40/C)测定。土壤总氮(TN)和总碳(TC)应

用元素分析仪测定(VarioEL ILL,Elementar Analysen- systeme,Hanau,Germany);土壤硝态氮(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)和铵 态氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)含量采用连续流动分析仪测定 (SKALAR, San + +,Netherlands)。其它土壤化学 指标测定采用 Lu 等<sup>[17]</sup>方法进行。

土壤硝化潜势依据 Hart 等<sup>[18]</sup>泥浆振荡方法测 定,计算公式为:

$$\omega(N) = \frac{\rho_2 - \rho_1}{t} \times \frac{V_1 + V_2}{m \times k}^{[17]}$$

式中: $\omega(N)$ —单位时间内硝态氮的产生量, mg · kg<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>;  $\rho_1$ —原始土样中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量, mg · kg<sup>-1</sup>;  $\rho_2$ —一定培养时间后土样中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量, mg · kg<sup>-1</sup>;  $t$ —培养时间, h;  $V_1$ —液体培养基的体积, 0.100 0 L;  $V_2$ —土壤样品中水分的体积, L;  $m$ —样品 质量, kg。

1.3.2 氨氧化古菌 *amoA* 基因定量分析 以纯化 后的土壤总 DNA 为模板,使用引物对 Arch-*amoA*F/ Arch-*amoA*R(表 1)和 SYBR green I 染料,对土壤中 氨氧化古菌 *amoA* 基因进行定量扩增(Lightcycler 480II, Roche)。反应体系、反应程序及数据收集见 Chen 等<sup>[16]</sup>方法。

标准曲线绘制,即将目的片段 PCR 产物克隆到 载体 pGEM-T 中,应用 PurePlasmid Mini Kit (CW- BIO, Beijing, China) 试剂盒提取、纯化阳性克隆的质 粒 DNA。通过 Nanodrop 2000 测定质粒 DNA 浓度, 计算目的基因拷贝数。将已知浓度质粒 DNA 进行 10 倍系列稀释(10<sup>2</sup> ~ 10<sup>8</sup>),以稀释的质粒 DNA 为 模板进行 Real-time PCR 检测。以质粒 DNA 基因拷 贝数和浓度的指数绘制标准曲线。

### 1.3.3 连作大豆根际土壤氨氧化古菌多样性分析

将提取纯化后的土壤总 DNA 提交给测序公司 (美吉生物,上海)按照以下程序测序:基因组 DNA 提取→设计合成引物接头,PCR 扩增→荧光定量和 产物纯化→Miseq 平台测序。引物信息见表 1。

表 1 氨氧化古菌的引物及引物序列

Table 1 Ammonia oxidizing archaea primers name and primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	PCR 产物长度 PCR product length/bp
Arch- <i>amoA</i> F	STAATGGTCTGGCTTAGACG	635
Arch- <i>amoA</i> R	GCGGCCATCCATCTGTATGT	635
Gc-Arch- <i>amoA</i> F	STAATGGTCTGGCTTAGACG	635

### 1.4 数据 分析

应用 mothur 软件<sup>[19]</sup>,按照相似性为 97% 进行 Operational taxonomic units(OTUs)划分,并进行生物

信息统计分析。

1.4.1 多样性分析(Alpha-diversity) 菌群丰度(Community richness)指数和菌群多样性(Community diversity)指数采用 mothur 软件计算,分别见网站 Chao-the Chao 1 estimator(<http://www.mothur.org/wiki/Chao>)和 Shannon-the Shannon index(<http://www.mothur.org/wiki/Shannon>)。

1.4.2 群落结构与环境因子相关性分析 采用 Canonical Correspondence Analysis(CCA) for Windows V 4.5<sup>[20]</sup> 软件,用 Illumina Miseq 测序的 OUT 数量来计算氨氧化细菌群落结构与环境因子的相关关系。

## 2 结果与分析

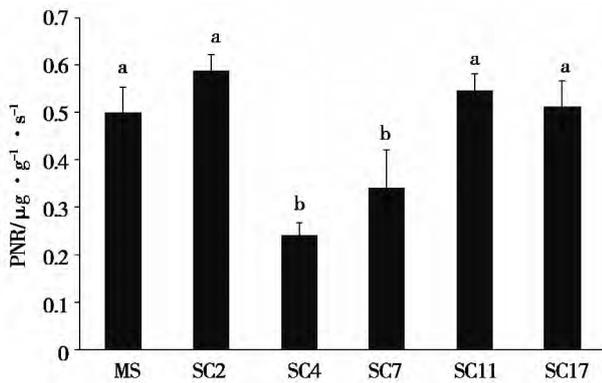
### 2.1 不同大豆种植处理对土壤养分状况和土壤潜在硝化速率的影响

不同连作大豆处理土壤养分含量结果表明,各

表 2 不同大豆种植处理土壤化学养分性状

Table 2 Chemical characteristics of black soil under different soybean cropping systems

	MS	SC2	SC4	SC7	SC11	SC17
相对湿度 Moisture/%	12.90	14.10	15.00	12.20	14.70	14.60
土壤有机质含量 OM/g·kg <sup>-1</sup>	25.00	27.10	26.90	25.90	25.70	26.00
pH	5.22	5.92	5.98	5.78	5.74	5.74
土壤总碳含量 TC/g·kg <sup>-1</sup>	16.00	16.37	16.53	16.30	15.59	16.91
土壤总氮含量 TN/g·kg <sup>-1</sup>	1.06	0.99	1.00	0.95	0.94	1.00
土壤碳氮比 C/N	15.05	16.56	16.48	17.25	16.66	16.91
土壤硝态氮含量 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/g·kg <sup>-1</sup>	1.098	0.872	0.686	0.931	0.980	1.012
土壤氨态氮含量 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/g·kg <sup>-1</sup>	2.698	2.627	2.505	2.107	2.198	2.313



相同字母代表处理间差异不显著  $P < 0.05$ 。下同。

The same letter among treatments means no significant difference at  $P < 0.05$ . The same below.

图 1 连作大豆不同处理土壤潜在硝化速率(PNR)

Fig. 1 Potential nitrification rate(PNR) of black soil under different soybean cropping systems

### 2.2 连作大豆根际土壤氨氧化古菌群落丰度分析

对连作大豆根际土壤氨氧化古菌 *amoA* 基因定量分析显示,大豆连作 2 年处理土壤中氨氧化古菌

处理土壤有机质含量为 25 ~ 27.1 g·kg<sup>-1</sup>, 轮作处理最低。各处理土壤的 pH5.22 ~ 5.98, 总氮含量为 0.156% ~ 0.85%, 总磷含量为 0.145% ~ 0.18%, 处理之间差异不明显。连作 2 和 4 年的土壤硝态氮含量最低, 连作 7 年以后的土壤硝态氮含量随着连作年限的增加而增加。而轮作、连作 2 和 4 年处理的土壤铵态氮平均含量为 2.61 mg·kg<sup>-1</sup>, 高于连作 7, 11 和 17 年, 分别为 2.107, 2.198 和 2.313 mg·kg<sup>-1</sup> (表 2)。

大豆连续种植导致土壤潜在硝化速率显著变化(图 1)。连作大豆根际土壤的潜在硝化速率为 0.24 ~ 0.58 μg·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>。其中连作 4 和 7 年土壤潜在硝化速率显著低于其它处理。与轮作相比, 连作 4 和 7 年的土壤潜在硝化速率显著降低, 分别为 51.79% 和 31.58%, 而连作 2, 11 和 17 年分别增加 17.5%、9.3% 和 2.7%, 未达到显著水平。

*amoA* 基因丰度为  $5.68 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup>, 显著低于轮作处理。而连作 4 年土壤中氨氧化古菌 *amoA* 基因丰度最高, 高于轮作处理, 差异不显著, 但随着连作年限的增加, *amoA* 基因丰度逐渐降低, 连作 17 年处理降至最低, 为  $4.12 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup>, 与连作 2 年土壤差异不显著, 显著低于轮作和其它连作处理(图 2)。

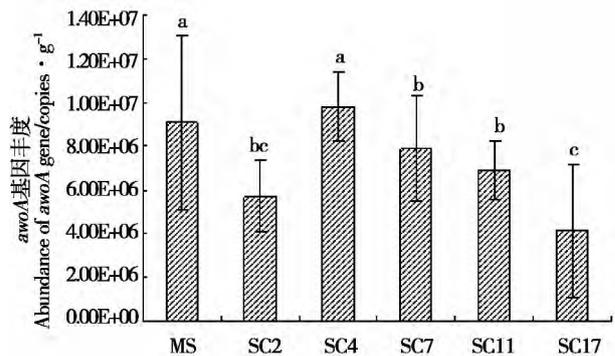


图 2 不同大豆种植体系氨氧化古菌 *amoA* 基因丰度

Fig. 2 Abundance of archaea *amoA* gene under different soybean cropping systems

### 2.3 连作大豆根际氨氧化古菌群落多样性分析

本研究共获得了 148 673 条氨氧化古菌的有效序列, 基于 97% 的相似性水平可划分为 89 个不同的 OTU 类群。对比各处理间的多样性指数发现,

MS 处理和连作 2 年的土壤氨氧化古菌的 Ace、Chao 和 Shannon 指数明显高于其它连作时间较长的样品, 说明大豆连作降低了土壤中氨氧化古菌的种类 (表 3)。

表 3 氨氧化古菌的多样性指数

Table 3 Shannon index of ammonia oxidizing archaea(97%)

处理 Treatment	序列读长 Sequence length/bp	OTU	Ace 指数 Ace index	Chao 指数 Chao index	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index
MS	23054	64	68	66	2.65	0.1077
	25546	67	99	82	2.44	0.1230
	17770	72	79	77	2.80	0.0930
SC2	14635	65	107	82	2.57	0.1126
	27194	70	104	116	2.78	0.0884
	26892	72	81	78	2.51	0.1270
SC4	23558	63	70	68	2.53	0.1138
	27955	65	85	78	2.49	0.1180
	23473	59	61	60	2.55	0.1123
SC7	24935	60	65	63	2.34	0.1344
	34292	69	73	80	2.64	0.1064
	25698	74	81	79	2.73	0.0983
SC11	27366	63	73	69	2.47	0.1144
	24543	59	67	65	2.40	0.1253
	31233	65	78	76	2.48	0.1244
SC17	27584	58	72	62	2.24	0.1759
	18451	51	54	52	2.47	0.1180
	21844	57	67	66	2.45	0.1194

### 2.4 不同年限连作大豆根际氨氧化古菌群落结构分析

测序共得到 178 603 条有效序列, 序列片段在 400 bp 左右, 平均每个样品的测序深度为 11 162 条有效序列(7 710 ~ 13 317 条)。比对结果可以看出, 黑土根际的主要氨氧化古菌微生物类群隶属于泉古菌门(*Crenarchaeota*) 和奇古菌门(*Thaumarchae-*

*ota*) , 同时还有 42% 以上的氨氧化古菌尚未有明确的分类, 说明土壤中氨氧化古菌种群较丰富。对比两大菌门在不同处理之间氨氧化古菌群落组成可以看出, 泉古菌门在各处理土壤中的群落组成相对稳定; 而奇古菌门对根际环境较为敏感, 连作 2 年处理的丰度较低, 但不显著(图 3)。

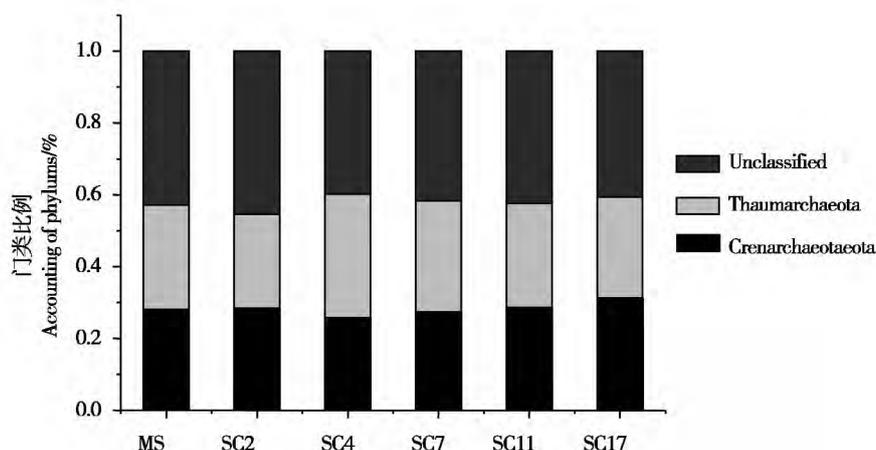


图 3 不同连作年限下氨氧化古菌群落结构组成

Fig. 3 Ammonia oxidizing archaea composition under different continuous cropping years

## 2.5 连作大豆根际氨氧化古菌群落结构与环境因子相关性分析

将连作大豆根际土壤氨氧化古菌高通量测序结果,通过 mothur 软件在 97% 相似度基础上划分每个处理的 OUT 代表各处理氨氧化古菌群落结构组成,以表 2 所示的土壤性状作为环境因子,应用 CCA 软件分析氨氧化古菌群落组成与环境因子之间的关系(图 4)。结果表明,第一和第二组成成分对大豆根际氨氧化古菌群落组成的解释率分别为 49.3% 和 30.2%。与环境因子相关关系分析通常认为群落结构的分布位置和原点连线与环境因子分布方向呈锐角,则呈正相关关系;如果呈钝角则呈负相关关系。本研究结果表明:轮作和连作 2 年大豆根际土壤氨氧化古菌群落结构组成与土壤总氮含量、总碳含量呈正相关关系,与连作 4 年以上处理的氨氧化古菌群落组成呈负相关关系;土壤潜在硝化速率与轮作处理呈正相关关系。而连作 4 年以上处理的氨氧化古菌群落结构组成与 pH 和碳氮比呈正相关关系,与轮作处理呈负相关关系,与连作 2 年处理无相关关系。

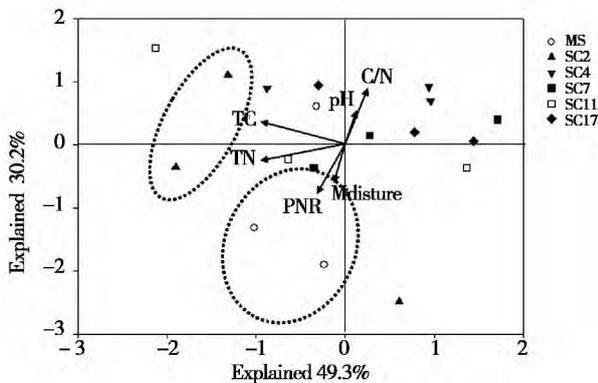


图 4 不同连作年限氨氧化古菌群落结构组成与环境因子关系分析

Fig. 4 Correlation between AOA community structure composition and environment factors

## 3 讨论

植物种类互作也是调节氮素转化的重要方法。有研究表明,与豆科植物混作的作物根际硝化活性提高<sup>[21-23]</sup>。较高的土壤氨氧化速率意味着较快的氮循环。因此,混作有利于提供植物根际硝化活性,促进作物氮吸收<sup>[24]</sup>,在其研究中土壤硝化活性为  $1.2 \sim 7.0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,而本文的潜在硝化活性为  $0.34 \sim 0.58 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,差异显著,由此可以看出大豆连年种植明显改变了根际土壤中氨氧化微生物群落组成,进而降低了土壤氮素转化速率。本文对连作大豆根际氨氧化古菌基因丰度测定结果表

明:连作 2 年处理的基因拷贝数低于轮作处理,而连作 4 年的氨氧化古菌拷贝数最高,随后随着连作年限的增加,基因丰度逐渐降低。

本文通过 Illumina Miseq 测序结构证实了连作大豆根际氨氧化古菌的 58% 来自泉古菌门(*Crenarchaeota*)和奇古菌门两大类(*Thaumarchaeota*) (图 3),也是黑土根际的主要氨氧化古菌微生物类群<sup>[9]</sup>。将高通量测序结果进行 Ace、Chao 和 Shannon 多样性指数计算,除连作 2 年处理的多样性指数显著高于其它处理以外,轮作处理的各多样性指数高于连作处理(表 2)。对氨氧化古菌进行 Illumina Miseq 测序深入解析连作大豆根际氨氧化古菌的群落结构组成,结果显示:连作大豆根际土壤中氨氧化古菌种类丰富。本研究结果与 Wang<sup>[25]</sup>的研究结果一致,其认为大豆连作 4 年以前,随着连作年限的增加氨氧化古菌的基因拷贝数降低,而连作 4 年以后又出现新的从高到低的数量变化过程。由此认为连作年限是影响大豆根际氨氧化微生物群落组成的重要因素,但除此以外,由连作年限导致的土壤微环境的变化间接的影响,Wang<sup>[25]</sup>认为大豆根际分泌物大豆苷元和染料木因可能是导致连作大豆根际氨氧化古菌群落变化的原因之一,具体作用机理还有待于进一步研究。

## 4 结论

连作年限影响大豆根际氨氧化古菌群落组成和数量的重要因素。由 *amoA* 基因拷贝数和主成分分析结果可以看出,连作 2 和 17 年处理处理的 *amoA* 基因拷贝数低于其它处理,连作 7 年最高。高通量测序结果表明连作大豆根际氨氧化古菌种类来自泉古菌门(*Crenarchaeota*)和奇古菌门两大类(*Thaumarchaeota*),仍有 42% 未分类的古菌种类。

## 参考文献

- [1] Okano Y, Hristova K R, Leutenegger C M, et al. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(2): 1008-1016.
- [2] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso sea [J]. Science, 2004, 304: 66-74.
- [3] Jia Z J, Conrad R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil [J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(7): 1658-1671.
- [4] Hatzepichler R. Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(21): 7501-7510.
- [5] Gubry-Rangin C, Nicol G W, Prosser J I. Archaea rather than

- bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2010, 74: 566-574.
- [6] Zhang L M, Wang M, Prosser J I, et al. Altitude ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils of Mount Everest [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2009, 70: 208-217.
- [7] Xia Y, Zhu Y G, Gu Q, et al. Does long-term fertilization treatment affect the response of soil ammonia-oxidizing bacterial communities to Zn contamination? [J]. *Plant Soil*, 2007, 301: 245-254.
- [8] Ying J Y, Zhang L M, He J Z. Putative ammonia-oxidizing bacteria and archaea in an acidic red soil with different land utilization patterns [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(2): 304-312.
- [9] Fan F L, Yang Q B, Li Z J, et al. Impacts of organic and inorganic fertilizers on nitrification in a cold climate soil are linked to the Bacterial Ammonia Oxidizer community [J]. *Microbial Ecology*, 2011(a), 62(4): 982-990.
- [10] Ruan W B, Wang J G, Zhang F S. The effect of continuous cropping factors on soybean seedling growth and nitrogen fixation [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(1): 22-29.
- [11] 邹莉,袁晓颖,李玲,等. 连作对大豆根部土壤微生物的影响研究 [J]. *微生物学杂志*, 2005, 25(2): 27-30. (Zou L, Yuan X Y, Li L, et al. Effect continuous cropping on soil microbes on soybean roots [J]. *Journal of Microbiology*, 2005, 25(2): 27-30.)
- [12] 范晓辉,刘芷宇. 根际 pH 环境与磷素利用研究进展 [J]. *土壤通报*, 1992, 23(5): 228-240. (Fan X H, Liu Z Y. Research progress on rhizosphere pH environment and P utilization [J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 1992, 23(5): 228-240.)
- [13] 王光华,金剑,潘相文,等. 不同茬口大豆根圈土壤 pH 值和氮营养分布的变化 [J]. *中国油料作物学报*, 2004, 26(1): 55-59. (Wang G H, Jin J, Pan X W, et al. Rhizosphere soil pH value and the nitrogen nutrition distribution change of different soybean crop system [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2004, 26(1): 55-59.)
- [14] 王金龙,徐冉,王彩洁,等. 大豆连作条件下土壤环境的变化及其危害 [J]. *山东农业科学*, 2005(2): 54-57. (Wang J L, Xu R, Wang C J, et al. Change and harm under the condition of soybean continuous cropping soil environmental [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2005(2): 54-57.)
- [15] 苗淑杰,乔云发,韩晓增. 大豆连作障碍的研究进展 [J]. *中国生态农业学报*, 2007, 15(3): 203-206. (Miao S J, Qiao Y F, Han X Z. Review of researches on obstacles of continuous cropping of soybean [J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2007, 15(3): 203-206.)
- [16] Chen X L, Wang Y F, Li W Q, et al. Impact of long-term continuous soybean cropping on ammonia oxidizing bacteria communities in the rhizosphere of soybean in Northeast China [J]. *Acta Agriculture Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 2015, 65(5): 470-478.
- [17] Lu R K. *Agricultural chemical analysis of the soil* [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000.
- [18] Hart S C, Stark J M, Davidson E A, et al. Nitrogen mineralization, immobilization and nitrification/Weaver R W, Angle J S, Bottomley P S. *Methods of soil analysis. part 2. Microbial and biogeochemical properties* [C]. Madison: Soil Science Society of America, 1994: 985-1018.
- [19] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: Open source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 7537-7541.
- [20] Ter Braak C J F, Smilauer P. *CANOCO reference manual and canodraw for windows user's guide: Software for canonical community ordination (version 4.5)* [M]. Ithaca: Microcomputer Power, 2002: 1-500.
- [21] Niklaus P A, Wardle D A, Tate K R. Effects of plant species diversity and composition on nitrogen cycling and the trace gas balance of soils [J]. *Plant and Soil*, 2006, 282: 83-98.
- [22] Rodríguez A, Durán J, Gallardo A. Influence of legumes on N cycling in a heathland in northwest Spain [J]. *Webog*, 2007, 7: 87-93.
- [23] Scherer-Lorenzen M, Palmborg C, Prinz A, et al. The role of plant diversity and composition for nitrate leaching in grasslands [J]. *Ecology*, 2003, 84: 1539-1552.
- [24] Fan F L, Zhang F S, Lu Y H. Linking plant identity and interspecific competition to soil nitrogen cycling through ammonia oxidizer communities [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43: 46-54.
- [25] Wang J L. *Rhizospheric bacterial and ammonia-oxidizer communities under continuous monoculture of soybean crop* [C]. Beijing: China Agricultural University, 2014.