中国生态农业学报(中英文)
Chinese Journal of Eco-Agriculture
中文核心期刊
中国科技核心期刊
中国精品科技期刊
百种中国杰出学术期刊
中国科学引文数据库源刊

不同施肥方式下土壤氨氧化细菌的群落特征

任灵玲，李秀玲，刘灵芝

引用本文:
任灵玲, 李秀玲, 刘灵芝. 不同施肥方式下土壤氨氧化细菌的群落特征[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2019, 27(1): 11–19.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.180645

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

氮肥水平对稻田细菌群落及N2O排放的影响

Effect of nitrogen fertilizer level on bacterial community and N2O emission in paddy soil

中国生态农业学报. 2017, 25(9): 1266–1275 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.170146

氮肥施加条件下增温对硝化菌活性和丰度的影响

Impact of soil warming on the activity and abundance of nitrifiers under nitrogen fertilization conditions

中国生态农业学报(中英文). 2019, 27(11): 1649–1655 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.190166

耕层土层交换对土壤氮素关键转化过程和玉米氮素利用的影响

Effects of soil layers exchange on key nitrogen transformation processes in soil and nitrogen utilization by maize

中国生态农业学报(中英文). 2019, 27(10): 1515–1527 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.190265

不同深度土壤控水对稻田土壤微生物区系及细菌群落多样性的影响

Influence of water controlling depth on soil microflora and bacterial community diversity in paddy soil

中国生态农业学报(中英文). 2019, 27(2): 277–285 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.180373

转基因水稻秸秆还田对土壤硝化反硝化微生物群落的影响

Effect of transgenic rice straw return to soil on nitrification and denitrification microbial community

中国生态农业学报. 2018, 26(1): 8–15 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.170794

中国生态农业学报(中英文) 2019 年 1 月 第 27 卷 第 1 期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Jan. 2019, 27(1): 11−19

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.180645

任灵玲, 李秀玲, 刘灵芝. 不同施肥方式下土壤氨氧化细菌的群落特征[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2019, 27(1): 11−19
REN L L, LI X L, LIU L Z. Community characteristics of soil ammonia oxidizing bacteria after different fertilizer applications[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2019, 27(1): 11−19

不同施肥方式下土壤氨氧化细菌的群落特征*

任灵玲, 李秀玲, 刘灵芝**

(沈阳农业大学土地与环境学院/土肥资源高效利用国家工程实验室/农业部东北耕地保育重点实验室 沈阳 110866)

摘 要: 为了研究长期定位施肥对棕壤中氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)种群结构多样性和垂直分布特征的影响, 本研究采用化学分析、荧光定量 PCR(qPCR)和变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术, 针对沈阳农业大学试验区不同施肥方式(不施肥、低量无机氮肥、高量无机氮肥、无机氮肥与有机肥配施)下不同土壤深度(0~20 cm、20~40 cm、40~60 cm)的土壤理化性质、AOB 丰度及种群多样性进行分析, 比较不同施肥方式对土壤 AOB 种群的影响。结果显示, 与不施肥相比, 施肥会降低土壤 pH, 增加土壤铵态氮(70.5%~939.21%)和硝态氮(253.20%~625.48%)含量。随土壤深度增加, 土壤 pH 升高, 铵态氮和硝态氮含量除低量无机氮肥处理外, 多呈降低趋势。土壤增施氮肥可提高 AOB 丰度, 降低总细菌丰度。其中, 0~20 cm 土层中 AOB 丰度较高, 且高量无机氮肥处理的 AOB 数量最高, 为 9.65×10^5 拷贝数·g^{-1}(干土)。DGGE 图谱分析显示, 不同处理下, AOB 群落结构多样性指数存在明显差异($P<0.05$), 各多样性指数均在表层(0~20 cm)最高, 增施氮肥则显著降低 AOB 的多样性。聚类分析表明, 4 个施肥处理中, 高量无机氮肥处理聚为一类, 其他处理则因土壤深度不同而异; 3 个土壤深度中, 除不施肥处理外, 所有施肥处理均表现为 0~20 cm、20~40 cm 土层发生聚类, 40~60 cm 则明显与其他两层分开。冗余梯度分析(RDA)显示, 硝态氮($P=0.027$)是造成影响 AOB 群落结构差异的主要原因。上述研究结果表明, 长期定位施肥土壤 AOB 的数量和群落结构多样性受施肥方式显著影响, 并表现出明显的垂直分布特征。与无机氮肥相比, 有机无机配施处理有助于改善土壤 pH, 维持不同土壤深度下 AOB 群落结构多样性。

关键词: 棕壤; 施肥方式; 氮肥; 氨氧化细菌(AOB); 群落结构; 土壤深度
中图分类号: S147.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-6237(2019)01-0011-09

Community characteristics of soil ammonia oxidizing bacteria after different fertilizer applications*

REN Lingling, LI Xiuling, LIU Lingzhi**

(College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University / National Engineering Laboratory for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources / Arable Land Conservation in Northeast China, Ministry of Agriculture, Shenyang 110866, China)

Abstract: Studies about ammonia oxidizing bacteria (AOB) have mainly focused on the topsoil and little has remained known about community distribution in the subsoil. There therefore has remained the need to understand the impact of long-term fertilization on AOB abundance, community structure and vertical distribution in order to deepen the exploration of microbial mechanisms of nitro-

* 辽宁省高等学校基本科研项目(LSNZD201705)和国家自然科学基金项目(31101504)资助
** 通信作者: 刘灵芝, 主要研究方向为土壤微生物。E-mail: liulingzhi2006@163.com
任灵玲, 主要研究方向为农业环境保护。E-mail: 1464697578@qq.com
收稿日期: 2018-07-08 接受日期: 2018-09-30
* This study was supported by the Basic Research Projects of Liaoning Higher Education Institutions (LSNZD201705) and the National Natural Science Foundation of China (31101504).
** Corresponding author, E-mail: liulingzhi2006@163.com
Received Jul. 8, 2018; accepted Sep. 30, 2018

gen (N) transformation and to develop sound fertilization regimes for sustainable soil quality in the study area and beyond. Thus, a long-term (1987–2015) fertilization experiment was set up in the brown earth in Shenyang Agriculture University, Liaoning Province, China. Four treatments were set, no fertilizer (CK), low N fertilizer (N_2), high N fertilizer (N_4) and low N fertilizer plus organic mature (M_2N_2). Soil samples were collected at three different depths (0–20 cm, 20–40 cm and 40–60 cm). The soil physico-chemical properties, 16S rDNA and AOB-*amo*A gene abundance (real-time PCR, qPCR) and AOB community structure and diversity (denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) were investigated. While soil pH decreased, the content of soil ammonium N (NH_4^+-N) increased by 70.5%–939.21% and that of nitrate N (NO_3^--N) by 253.20%–625.48% in the fertilization treatments over CK treatment. Also while soil pH increased, the contents of soil NH_4^+-N and NO_3^--N decreased with increasing soil depth, except for N_2 treatment. The results of qPCR showed that fertilization treatments increased AOB abundance, but decreased total bacterial abundance compared to CK treatment. AOB *amo*A gene abundance was generally higher at the 0–20 cm than at the 20–40 cm and 40–60 cm soil layers. AOB abundance peaked in the N_4 treatment, with 9.65×10^5 copies per g dry soil. The Shannon diversity (*H*), evenness (E_H) and richness (*S*) indexes of AOB from DGGE fingerprints responded increasingly significantly ($P < 0.05$) to fertilization regimes and soil-fertilization interactions with increasing soil depth. Although the tested diversity indexes were highest in the surface soil (0–20 cm), N fertilizer treatments (N_2, N_4 and M_2N_2) significantly reduced AOB diversity indexes. Based on cluster analysis of the DGGE fingerprints, AOB community structure in the soil varied with fertilization treatments and soil depth. Three soil depths of high N fertilizer (N_4) treatment was grouped together clearly. For other treatments, it was grouped according to soil depth with no discernible difference in AOB community structure among CK, N_2 and M_2N_2 treatments. The 0–20 cm and 20–40 cm deep soils under fertilizer treatments formed single cluster with no less than 57% similarity, while 40–60 cm soil layer formed another cluster. Redundant gradient analysis (RDA) further showed that NO_3^--N ($P = 0.027$) was the key factor that shaped AOB community under different fertilization treatments. The results indicated that AOB number and community structure diversity after long-term fertilization significantly varied with fertilization treatment, and showed obvious vertical distribution characteristics. Compared with chemical fertilizer (N_2 and N_4) application, organic manure plus chemical fertilizer (M_2N_2) more favorably improved soil pH and maintained AOB community diversity in the subsoil.

Keywords: Brown soil; Fertilization regime; Nitrogen fertilizer; Ammonia oxidizing bacteria (AOB); Community structure; Soil depth

硝化作用是土壤氮素转化的关键过程，由氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)和氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)驱动的氨氧化过程作为硝化作用的限速步骤，可通过其数量、多样性、结构组成的改变来响应土壤氮素转化[1]。许多研究指出，酸性土壤中长期施肥可改变 AOA 的丰度和群落结构，中性或碱性土壤中 AOB 比 AOA 更敏感。Chen 等[2]在研究水稻(*Oryza sativa* L.)酸性红壤发现，各施肥处理中 AOA 丰度变化明显，而 AOB 几乎没有区别。Wu 等[3]研究小麦(*Triticum aestivum* L.)中性土壤中发现，长期施肥(22 年)显著改变 AOB 的群落结构，而 AOA 则保持不变。近年来，Hayatsu 等[4]在日本茶园土壤中成功分离出嗜酸性 AOB，使得这类微生物在酸性土壤中的作用有了新的认知。研究表明，土壤 pH、氮素种类、土壤类型、施肥方式和作物品种等因素，均可对氨氧化微生物产生特异的选择性。Fan 等[5]研究长期施肥水稻土指出，AOB 的数量和群落结构较 AOA 变化明显，增施氮肥可显著提高 AOB 的多样性。Ai 等[6]发现，小麦与玉米(*Zea mays* L.)轮作潮土中，施加氮肥可显著提高 AOB 数量。Kumar 等[7]和 Liu 等[8]研究酸性土壤时均指出，配施有机肥可显著增加土壤中 AOB 的数量和群落结构多样性。Ouyang 等[9]在美国的犹他州粉砂壤土中也发现，有机氮肥可显著提高 AOB-*amo*A 基因丰度，且氨氧化细菌的活性随有机肥料增加而增加。

农业生态系统中，不同施肥方式可通过影响土壤理化特征，改变功能微生物的丰度及群落结构组成，进而对土壤质量和生态功能产生影响。许多研究表明，较单施化肥相比，无机有机氮肥配施的农田管理模式，有助于优化土壤微生物群落结构，改良土壤理化属性和养分供应状况，维持并提高土壤质量。Kumar 等[7]研究长期施肥的水稻土时指出，无机有机肥配施可以缓解土壤酸化，稳定土壤功能和丰富功能基因。Zhao 等[10]研究小麦与水稻轮作的黏土时指出，无机有机肥配施可显著提高土壤有效养分、微生物量以及微生物多样性，对于可持续的农业生产来说，无机有机肥配施是一种较好的施肥方式。然而，在长期施肥模式下，针对棕壤中氨氧化细菌群落结构多样性对不同施肥方式，特别是有机无机肥配施的响应特征，及其随土壤深度增加的变化差异等相关研究少有报道，这些研究结果对于探索不同施肥模式下土壤氮素转移与变化规律具有指导意义。

为进一步认识长期定位不同施肥模式下棕壤氨氧化细菌的变化特征, 采用 PCR-DGGE 和 qPCR 技术, 以沈阳农业大学长期定位试验田为平台, 比较 4 种施肥方式下, 长期定位棕壤 AOB 的丰度与种群结构差异, 同时结合土壤理化性质的分析, 探讨 AOB 对不同施肥方式的响应机制和垂直分布特征, 为维持土壤质量、稳定生产力提供依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料与样品采集

试验地位于辽宁省沈阳市沈阳农业大学长期定位试验站(41°49′N, 123°34′E), 该地区属于大陆性季风气候, 年平均气温 8.0 ℃, 年均降水量为 705 mm。土壤类型属于中厚层棕壤。长期定位试验始于 1987 年, 种植作物为玉米。施肥方式设置为 4 个处理, 分别为不施肥[CK, 0 kg(N)·hm^{-2}]、施低量氮肥(N_2, 年施尿素氮 135 kg·hm^{-2})、施高量氮肥(N_4, 年施尿素氮 270 kg·hm^{-2})和尿素氮肥与有机肥配施(M_2N_2, 其中尿素氮 135 kg·hm^{-2}; 有机肥为猪厩肥, 其中含纯 N 135 kg·hm^{-2})。小区面积为 69 m^2, 不同施肥处理 3 次重复。

土壤采集于 2015 年 7 月 20 日(玉米抽雄期), 采用对角线五点采样法, 采集 0~20 cm、20~40 cm 和 40~60 cm 剖面深度的土壤。每个小区同一土层的土壤组成混合代表样, 所取土壤去除杂物, 碾碎后混匀, 一部分用冰盒保存带回实验室后–80 ℃保存, 另一部分装入自封袋带回实验室后 4 ℃保存, 用鲜土样测定硝化强度、铵态氮和硝态氮含量, 剩余土壤自然风干后测定土壤 pH。

1.2　土壤理化指标的测定

土壤 pH 测定采用电位法(土∶水=1∶2.5); 土壤铵态氮和硝态氮用 0.01 mol·L^{-1} $CaCl_2$ 浸提新鲜土样后, 采用连续流动注射分析仪(AA3-HR, SEAL, Germany)测定; 硝化强度的测定参照赵爽等[11]的方法。

1.3　土壤微生物总 DNA 提取

土壤微生物 DNA 的提取采用 E.Z.N.Z.TM Soil DNA Kit(OMEGA), 获得 DNA 后用 Qubit 测定浓度, 并采用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA 质量, –20 ℃保存。

1.4　细菌 16S rDNA 和 AOB *amo*A 基因的荧光定量 PCR

分别用引物 515F/907R 和 *amo*A-1F/*amo*A-2R 扩增细菌 16S rDNA 和 AOB *amo*A 基因, PCR 体系为 50 μL, 分别含 10×Buffer 5.0 μL, dNTP(各 2.5 μmol·L^{-1}) 4.0 μL, 上下游引物(10 μmol·L^{-1})各 1.0 μL, DNA 模板(1~10 ng) 2 μL, rTaq(5 U·μL^{-1})1.0 μL, 最后用 ddH_2O 补至 50.0 μL。PCR 程序: 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s, 53 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 45 个循环; 最后 72 ℃延伸 10 min。回收 PCR 产物连接至 pMD18-T 载体, 转化至大肠杆菌 DH5α 感受态中, 经 Amp$^+$、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板筛选阳性克隆, 测序分析。

标准曲线的制作: 提取测序正确的细菌 16S rDNA、AOB *amo*A 基因的阳性克隆质粒, 用 Qubit 测其浓度, 按 10 倍梯度稀释质粒成实时荧光定量 PCR 测定标准品, –20 ℃保存。

荧光定量 PCR 在 ABI 7500 StepOne Plus 上进行, 反应体系为 20 μL, 分别含 GoTaq®qPCR Master Mix 10.0 μL, 上下游引物各 0.8 μL(10 μmol·L^{-1}), DNA 模板 2.0 μL(1~10 ng), 用 ddH_2O 补至 20.0 μL。qPCR 引物及程序如表 1 所示。

将稀释 100 倍的土壤 DNA 样品与标准品一起进行 Real-Time PCR 检测, 包括阴性对照在内每个样品设 3 个重复。细菌 16S rDNA 基因标准曲线的 R^2 为 0.99, 扩增效率为 99.67%, AOB-*amo*A 基因标准曲线的 R^2 为 0.993, 扩增效率为 107.73%。

表 1　细菌 16S rDNA 和氨氧化细菌(AOB)定量 PCR 扩增引物及反应条件

Table 1　Primers and conditions of real-time PCR of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and bacterial 16S rDNA

微生物 Microbe	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	片段长度 Fragment length (bp)	qPCR 程序 Thermal profile for real-time PCR
AOB	*amo*A-1F: GGGGTTTCTACTGGTGGT *amo*A-2R: CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	466	94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 30 s, 53 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s; 45 个循环。 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 53 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s; 45 cycles.
16S rDNA	515F: GTGCCAGCMGCCGCGG 907R: CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	392	95 ℃预变性 5 min, 95 ℃变性 15 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s; 45 个循环。 95 ℃ 5 min, 95 ℃ 15 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s; 45 cycles.

1.5　氨氧化细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增

利用巢式扩增方法扩增氨氧化细菌的 V3 区域, 反应体系为 25 μL, 其中模板 1 μL、前后引物(20 mmol·L^{-1})各 0.5 μL、2×Taq Master Mix 12.5 μL、DNA-Free Water 10.5 μL。共使用 3 对引物 8F/1492R、CTO 189F/654R、341F/519R(表 2), 其中 CTO 189F/654R 是针对 *β*-AOB 的一对特异性较高的引物。最后得到的 PCR 产物约 190 bp, 用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测后可用于 DGGE 分析。

表 2 用于 PCR-DGGE 的扩增引物及反应程序

Table 2 Primers and PCR thermal profiles used for the detection of 16S rDNA gene fragments

	引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence (5′-3′)	PCR 程序 Thermal profile for PCR	参考文献 Reference
AOB	8F 1492R	TCCGGTTGATCCTGCC GGCTACCTTGTTACGACTT	94 ℃预变性 4 min; 94 ℃变性 1 min, 58 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 90 s, 35 个循环; 72 ℃终延伸 10 min。 94 ℃ 4 min; 94 ℃ 1 min, 58 ℃ 1 min, 72 ℃ 90 s, 35 cycles, 72 ℃ 10 min.	[12]
	CTO189F CTO654R	GGAGGAAAGTAGGGGATCG CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC	95 ℃预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 10 个循环; 92 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 25 个循环; 72 ℃终延伸 10 min。 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1min, 10 cycles; 92 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 25 cycles. 72 ℃ 10 min.	[13] [14]
	GC-341F 519R	CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGG GGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAGG TATTACCGCGGCTGCTG	95 ℃预变性 4 min; 94 ℃变性 1 min, 60 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 2 min, 9 个循环; 94 ℃变性 30 s, 60 ℃退火 30 s, (–0.5 ℃/循环), 72 ℃延伸 2 min, 9 个循环; 94 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 2 min, 9 个循环; 72 ℃终延伸 8 min。 95 ℃ 4 min; 94 ℃ 1 min, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 2 min, 9 cycles; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, (–0.5 ℃/cycle), 72 ℃ 2 min, 9 cycles; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 2 min, 9 cycles; 72 ℃ 8 min.	

1.6 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

移取 PCR 产物 15 μL 进行 DGGE 分析，变性剂梯度范围为 35%~55%，聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%(100%的变性剂为尿素 7 mol·L^{-1} 和 40%的去离子甲酰胺)，在 1×TAE 缓冲液中，180 V、60 ℃缓冲液中电泳 6 h。电泳后采用 Gene Finder 法进行染色。然后用 Gel-Doc XR 凝胶成像系统照相保存。

1.7 数据分析

数据处理采用 SPSS 20.0 数据处理软件，差异显著性分析利用单因素方差分析(ANOVA)和多重比较法(Duncan); DGGE 图谱分析采用 Quantity-One 图像分析软件。土壤理化因子与氨氧化微生物群落特征相关性分析采用 Pearson 相关分析法。用 Shannon 多样性指数(H)、均匀度(E_H)和丰富度(S)等评价 AOB 群落结构多样性。采用 CANOCO 4.5.1 软件(Microcomputer Power, Ithaca, USA)分析 AOB 群落结构和土壤理化因子间的关系。多样性指数计算公式为: $H=-\sum(n_i/N)\ln(n_i/N)$, $E_H=H/\ln S$, 式中 n_i 为单一条带的强度，N 为所有条带的总强度，S 为每一泳道总的条带数。

2 结果与分析

2.1 长期不同施肥处理下土壤理化性质的变化

不同施肥处理对棕壤理化性质产生不同影响(表 3)。与不施肥相比，所有施肥处理均显著降低了 0~20 cm 土壤的 pH(4.55~5.47); 同时，施加无机肥的 N_2 和 N_4 处理显著降低 40~60 cm 土壤 pH，而施加有机肥的 M_2N_2 处理则表现出相反结果($P<0.05$)。同一施肥处理下，0~20 cm 土壤 pH 不同程度地低于其他土壤深度。土壤氮素含量表现为，与不施肥相比，所有施肥处理均可显著增加土壤 NH_4^+-N(0.51~5.30 mg·kg^{-1}) 和 NO_3^--N (6.24~45.27 mg·kg^{-1}) 的含量($P<0.05$)。除 N_2 处理外，同一施肥处理中，0~20 cm 土壤铵态氮与硝态氮含量均不同程度高于其他土壤深度。N_2 处理在相同土壤深度下，与 CK 处理间硝化强度无明显差异，M_2N_2 与 N_4 处理可明显增加表层土壤(0~20 cm)硝化强度。

2.2 长期不同施肥处理下土壤总细菌和 AOB 数量的变化

以 16S rDNA 和细菌 *amo*A 基因为靶标，用荧光定量 PCR 测定土壤总细菌和 AOB 的数量。结果显示，不同施肥处理下土壤总细菌数量为 4.30×10^9~7.27×10^{11} 拷贝数·g^{-1}(干土)。与不施肥相比，所有施肥处理均显著降低了 0~20 cm 土壤细菌的数量；各施肥处理间，在相同土壤深度下，N_4 处理土壤细菌数量均不同程度地低于 N_2 和 M_2N_2 处理。相同施肥处理下，M_2N_2 土壤细菌数量在不同土层中差异不明显，其他处理均表现为 40~60 cm 土壤细菌数量均显著低于 0~20 cm 土层(图 1)。

土壤 AOB 的数量为 1.31×10^5~9.65×10^5 拷贝数·g^{-1}(干土)。与不施肥相比，低量氮肥处理 N_2 显著增加了不同深度土壤中 AOB 数量，高量氮肥处理 N_4 中 AOB 在 20~40 cm 土层迅速升高，在 0~20 cm 和 40~60 cm 土层则显著降低。有机无机肥配施处理(M_2N_2)对 0~40 cm

表 3　不同施肥处理不同深度土壤理化性质的变化

Table 3　Vertical variations of the soil physico-chemical properties under different fertilization treatments

处理 Treatment	土层深度 Soil depth (cm)	pH	NH_4^+-N ($mg \cdot kg^{-1}$)	NO_3^--N ($mg \cdot kg^{-1}$)	硝化强度 Nitrifying capacity ($mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$)
CK	0~20	5.65±0.20b	0.57±0.01h	9.64±0.02h	2.2±0.05c
	20~40	5.71±0.05b	0.51±0.02i	6.24±0.01j	3.2±0.11b
	40~60	5.60±0.05bc	0.63±0.01g	6.66±0.02i	1.6±0.03d
N_2	0~20	4.95±0.03e	0.82±0.02f	27.46±0.14e	1.5±0.03cd
	20~40	5.41±0.15d	0.84±0.04e	44.19±0.14b	3.4±0.12b
	40~60	4.99±0.07e	1.34±0.05b	43.67±0.24c	1.5±0.05cd
N_4	0~20	4.55±0.06f	5.30±0.04a	45.27±0.30a	5.2±0.05a
	20~40	5.47±0.03cd	0.89±0.04c	43.87±0.13c	1.2±0.06d
	40~60	5.36±0.04d	0.87±0.07cd	42.29±0.27d	0.2±0.03e
M_2N_2	0~20	5.47±0.14cd	0.87±0.03d	22.04±0.06f	5.7±0.03a
	20~40	5.96±0.06a	0.48±004j	14.15±0.03f	5.5±0.05a
	40~60	5.99±0.02a	0.57±0.05h	14.00±0.03g	0.5±0.06de

CK、N_2、N_4 和 M_2N_2 分别为不施肥、施低量氮肥、施高量氮肥和有机无机肥配施处理。表中数据为平均值±标准误差，每列数据标有不同字母表示 Duncan 检测下差异显著(P<0.05)。CK: no fertilizer; N_2: low N fertilizer; N_4: high N fertilizer; M_2N_2: organic manure combined with chemical fertilizer. Data are mean ± standard deviation (n=3). In each column, data marked with different letters are significantly different according to Duncan test (P < 0.05).

土壤中 AOB 无明显影响，却显著降低 40~60 cm 土层 AOB 数量(图 1)。总体上，土壤施肥后，细菌和氨氧化细菌主要分布在 0~40 cm 土层区域中。

土壤 AOB 与总细菌的数量比值为 45.4~55.2。施肥总体上增加了二者的比值，且无机氮肥对二者比值的增加不同程度地高于无机有机氮肥配施处理(M_2N_2)，该结果应与增施氮肥后土壤细菌数量下降有关。

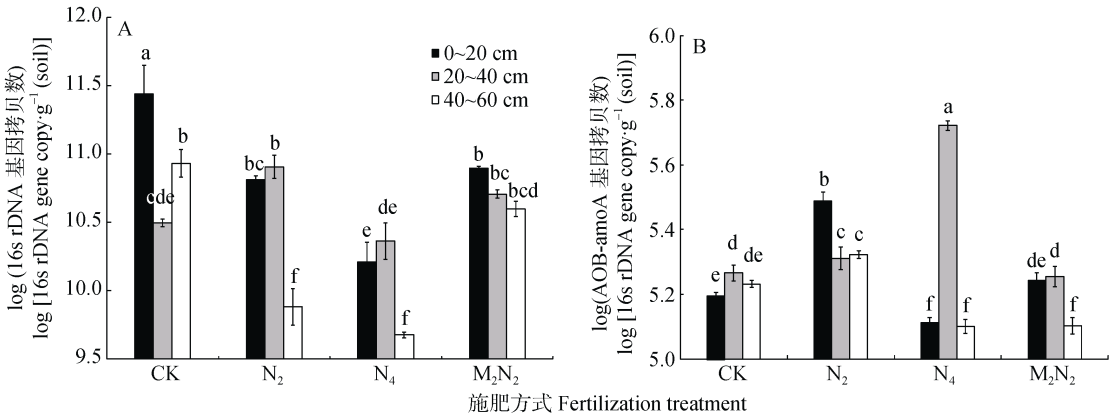

图 1　不同施肥处理下不同土层土壤细菌(A)和氨氧化细菌(AOB, B)基因丰度特征

Fig. 1　Abundances of soil bacteria (A) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB, B) at different soil depths under different fertilization treatments

CK、N_2、N_4 和 M_2N_2 分别为不施肥、施低量氮肥、施高量氮肥和有机无机肥配施处理。图中不同字母表示不同施肥处理不同土层间差异显著(P<0.05)。CK: no fertilizer; N_2: low N fertilizer; N_4: high N fertilizer; M_2N_2: organic manure combined with chemical fertilizer. Different letters above the bars indicate significant differences among different treatments at different soil depths based on protected LSD test (P < 0.05).

2.3　长期不同施肥处理下土壤 AOB 细菌群落结构的变化

2.3.1　DGGE 图谱

DGGE 技术是研究微生物种群结构的免培养手段之一，尽管检测通量有限，且只能检测生境中数量占优势的微生物种群，该技术重现性强、检测速度快、价格经济、结果直观等特点，使其一直被广泛应用于不同生境中微生物种群多样性及空间分布检测等相关领域[15-16]。不同施肥方式下土壤 AOB 群落结构的 DGGE 图谱见图 2A。不同处理土壤 AOB 群落结构的 DGGE 图谱在电泳条带数目、强弱和迁移位置均存在一定程度的差异，显示出AOB对环境因子变化的响应

特征。与不施肥相比，施肥处理土壤 AOB 的条带数减少。图中的共有条带(8、14 和 19)说明不同施肥处理土壤存在共有的 AOB 类群，但其亮度不同，说明这些 AOB 可能通过数量改变来响应环境的变化。条带 17、22 只存在于不施肥(CK)处理土壤中，而条带 9、10、18 只存在于高量无机氮肥(N_4)处理土壤中，说明这些 AOB 类群对土壤中氮素变化较为敏感。聚类分析显示(图 2B)，12 个处理(施肥处理×土层)聚为两大类群，N_4 处理单独聚成一类，且 0~20 cm 与 20~40 cm 土层土壤之间的相似性达 71%，说明施加高量无机氮肥可明显改变土壤中 AOB 的群落结构。另外，所有供试处理 0~20 cm 与 20~40 cm 土层土壤明显聚为一类，说明 AOB 群落结构在 0~20 cm 和 20~40 cm 土层较为相似，但在深层土壤(40~60 cm)发生明显变化。

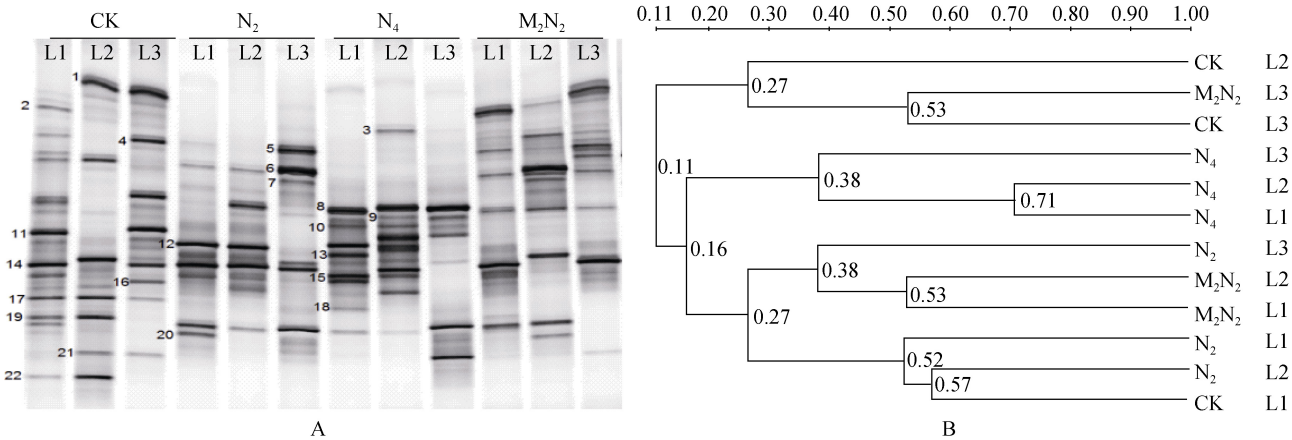

图 2 不同施肥处理下不同土层土壤氨氧化细菌(AOB)16S rDNA 基因 PCR-DGGE 电泳图谱(A)和聚类分析(B)

Fig. 2 PCR-DGGE fingerprinting (A) and cluster analysis (B) of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) 16S rDNA gene at different soil depths under different fertilization treatments

CK、N_2、N_4 和 M_2N_2 分别为不施肥、施低量氮肥、施高量氮肥和有机无机肥配施处理。L1、L2 和 L3 分别代表 0~20 cm、20~40 cm 和 40~60 cm 土层。CK: no fertilizer; N_2: low N fertilizer; N_4: high N fertilizer; M_2N_2: organic manure combined with chemical fertilizer. L1, L2 and L3 represent soil depths of 0–20 cm, 20–40 cm and 40–60 cm, respectively.

2.3.2 多样性指数

不同施肥处理下不同深度土壤 AOB 的 Shannon 多样性指数(H)、均匀度(E_H)和丰富度(S)存在明显差异(表 4)。与不施肥相比，施肥处理显著降低了土壤中 AOB 的多样性、均匀度和丰富度指数。不同施肥处理下 AOB 的 Shannon 多样性指数(H)、均匀度(E_H)和丰富度(S)指数表现为：CK>N_4>M_2N_2>N_2。相同施肥处理下，土壤中 AOB 多样性(H)、均匀度(E_H)和丰富度(S)指数均在表土层 0~20 cm 最高。随土壤深度增加，CK、N_2 和 N_4 处理下各多样性指数均表现出显著降低的趋势，M_2N_2 处理处理下 AOB 多样性指数则在不同土层中无明显差异。供试土壤中，N_2 处理各土层 AOB 种群多样性、均匀度和丰富度(40~60 cm 层除外)指数均为最低，而 N_4 处理则不同程度地提高了 20~40 cm 土壤 AOB 的各多样性指数，说明土壤施氮量可改变 AOB 在不同土层的分布情况。

表 4 不同施肥处理下不同土层土壤氨氧化细菌(AOB)的 Shannon 多样性指数(H)、均匀度(E_H)和丰富度(S)

Table 4 Shannon diversity index (H), evenness (E_H) and richness (S) of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) at different soil depths under different fertilization treatments

施肥处理 Fertilizer treatment	Shannon 多样性指数 Shannon's diversity index (H)			均匀度指数 Evenness (E_H)			丰富度 Richness (S)		
	0~20 cm	20~40 cm	40~60 cm	0~20 cm	20~40 cm	40~60 cm	0~20 cm	20~40 cm	40~60 cm
CK	1.13a	0.9d	0.98c	0.37a	0.29d	0.31c	14a	8d	10c
N_2	0.76f	0.45h	0.72g	0.25f	0.15h	0.23g	7e	6f	10c
N_4	1.04b	0.99c	0.76f	0.34b	0.32d	0.25f	12b	10c	6ef
M_2N_2	0.89d	0.89de	0.86e	0.29e	0.29e	0.28e	8d	8d	8d

CK、N_2、N_4 和 M_2N_2 分别为不施肥、施低量氮肥、施高量氮肥和有机无机肥配施处理。表中数据为平均值±标准误差，每列数据标有不同字母表示 Duncan 检测下差异显著(P<0.05)。CK: no fertilizer; N_2: low N fertilizer; N_4: high N fertilizer; M_2N_2: organic manure combined with chemical fertilizer. Data are mean ± standard deviation (n=3). In each column, data marked with different letters are significantly different according to Duncan test (P < 0.05).

2.4 长期不同施肥处理下土壤中 AOB 数量、丰度、群落结构与土壤理化性质的相关性分析

如表 5 所示, 土壤硝态氮含量与细菌丰度呈极显著负相关(r=–0.586, P<0.01), 铵态氮含量则与 AOB 丰度呈显著正相关(r=0.384, P<0.05), 土壤 pH 与细菌呈显著正相关(r=0.341, P<0.05), 与 AOB 呈显著负相关(r=–0.381, P<0.05)。多样性指数与理化因子的相关性分析表明, AOB 种群多样性指数(H)(r=–0.403, P<0.05)、均匀度指数(E_H)(r=–0.447, P<0.01)均与硝态氮呈显著负相关。丰富度(S)与土壤铵态氮(r=0.631, P<0.01)呈极显著正相关, 与 pH(r=–0.376, P<0.05)均呈显著负相关。土壤细菌与氨氧化细菌均与硝化强度无明显相关性。

表 5　土壤理化因子与氨氧化细菌(AOB)群落间的相关性

Table 5　Pearson's correlation coefficients between physicochemical properties and ammonia oxidizers community of soil

		NH_4^+-N	NO_3^--N	pH	硝化强度 Nitrifying capacity
AOB	Shannon 多样性指数 Shannon's diversity index	0.281	–0.403*	0.058	0.086
	均匀度指数 Evenness	0.231	–0.447**	0.093	0.073
	丰富度 Richness	0.631**	0.258	–0.376*	0.240
	log *amo*A	0.384*	0.071	–0.381*	0.216
细菌 Bacteria	log 16S rDNA	0.064	–0.586**	0.341*	0.142

Log *amo*A: *amo*A 基因拷贝数的对数; log16S rDNA: 16S rDNA 基因拷贝数的对数。*和**分别表示 P<0.05 和 P<0.01 水平显著相关。Log *amo*A: logarithm of number of *amo*A gene copies; Log16S rDNA: logarithm of number of 16S rDNA copies. * and ** mean significant correlation at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

以不同施肥处理土壤 DGGE 条带作为响应变量, 用土壤 pH、铵态氮、硝态氮、硝化强度作为解释变量进行冗余分析(RDA), 冗余分析中箭头表示环境因子, 箭头所处的象限表示环境因子与排序轴的正负相关性, 箭头连线长度表示该环境因子与样本分布相关程度的大小, 箭头连线间的夹角, 代表环境因子间的相关程度(图 3)。排序轴特征值分别为: 0.156、0.110、0.078、0.061, 分别解释了 15.1%、11.0%、7.8%、6.1%的 AOB 的群落变化。硝态氮的影响高于其他环境因子, 从图中可以看出土壤硝态氮(P=0.027)是造成群落差异的主要因素。pH(P=0.113)、铵态氮(P=0.35)、硝化强度(P=0.545), P>0.05, 对 AOB 群落结构没有显著影响。

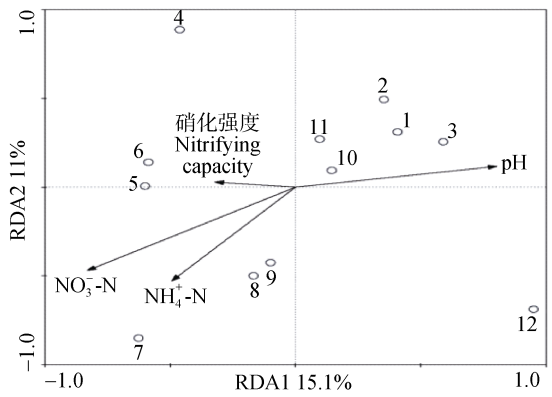

图 3　土壤氨氧化细菌与环境因子的冗余分析

Fig. 3　RDA analysis of ammonia oxidizing bacteria and soil environmental factors

1、2 和 3 为不施肥处理的 0~20 cm、20~40 cm 和 40~60 cm 土层; 4、5 和 6 为施低量氮肥 N_2 的 0~20 cm、20~40 cm 和 40~60 cm 土层; 7、8 和 9 为施高量氮肥处理的 0~20 cm、20~40 cm 和 40~60 cm 土层; 10、11 和 12 为 M_2N_2 有机无机肥配施处理的 0~20 cm、20~40 cm 和 40~60 cm 土层。In the figure, 1, 2 and 3 indicate 0–20 cm, 20–40 cm and 40–60 cm soil layers of no fertilizer treatment, respectively. 4, 5 and 6 indicate 0–20 cm, 20–40 cm and 40–60 cm soil layers of low N fertilizer treatment, respectively. 7, 8 and 9 indicate 0–20 cm, 20–40 cm and 40–60 cm soil layers of high N fertilizer treatment, respectively. 10, 11 and 12 indicate 0–20 cm, 20–40 cm and 40–60 cm soil layers of organic manure combined with chemical fertilizer treatment, respectively.

3　讨论

3.1　不同施肥处理及土壤深度变化对 AOB 数量的影响

通常认为, 土壤 pH 和肥料可影响土壤中 AOB 的数量, 土壤中氨氧化微生物数量与种群结构直接影响着土壤氮素供应状况[2]。本研究中 AOB 数量为 1.31×10^5~9.65×10^5 拷贝数·g^{-1}(干土), 与 Chen 等[2]研究长期施肥水稻土中 AOB 数量平均值为 1.90×10^5 拷贝数·g^{-1}(干土)的结果相似, 相较于 Liu 等[8]在南方酸性土壤中 AOB 数量 10^8 拷贝数·g^{-1}(干土)数量级低, 且总 AOB 数量与铵态氮呈显著正相关。杨亚东等[17]与 Wang 等[18]指出, AOB 适合在中性至碱性、氮素含量丰富的土壤中生存, AOB 数量与土壤 pH 呈显著负相关。研究中, 长期施肥导致土壤 pH 降低, 土壤呈酸性状态, 土壤 pH 与 AOB 数量呈显著负相关。分析其原因可能是 AOB 在适应长期施肥过程中, 耐酸型 AOB 数量增多。

通常情况下, NH_3 是微生物进行氨氧化作用的直接底物, NH_4^+则作为间接底物影响氨氧化微生物

的种类和数量[1]。由于酸性土壤中 NH_4^+解离出来的 NH_3 较少，从而抑制 AOB 的生长[19]。研究中，高量无机氮肥(N_4)处理下，20~40 cm 层土壤 AOB 数量明显高于其他处理，但土壤中 NH_4^+含量却小于 1 $mg·kg^{-1}$，其可能原因应是，有些 AOB 不以 NH_4^+作为惟一的底物，而以有机化合物作为底物生长(根系分泌物)[20]；另外，土壤中存在未知的 AOB，其对 NH_4^+有较高的亲和力，如在酸性土壤中占优势的亚硝化螺旋菌(*Nitrosospira*)[21]。

施肥过程中，不同施肥方式带入土壤中的物料不同，并在灌溉等管理措施下，使得不同深度土壤中微生物结构与土壤性质产生差异。李晨华等[22]研究新疆灰漠土发现，长期施肥可显著增加表层(0~20 cm)甚至是深层(20~300 cm)土壤氨氧化微生物的相对丰度。Wang 等[18]也发现，稻田土壤 0~20 cm 表土层中，AOB 数量是 20~80 cm 土层的 439 倍。本研究也获得了相似结果，细菌和 AOB 主要分布在 0~20 cm 和 20~40 cm 土层区域，其原因可能是长期施入的尿素氮随降水等措施下移至深土层，并作为底物，刺激 AOB 的生长。另外，李晨华等[23]在绿洲农田土壤的研究指出，氮肥可刺激表层土壤中 AOB 的生长，细菌细胞可随降水运移至深土层。

3.2 不同施肥处理及土壤深度变化对 AOB 群落结构多样性的影响

由 DGGE 图谱可知，不同土层不同施肥处理之间 AOB 条带存在明显差异，表明长期施肥处理显著改变了土壤氨氧化细菌群落结构特征。与 CK 相比，所有施肥处理(N_2、N_4 和 M_2N_2)的 AOB 群落结构多样性均有所降低，该结果与 Ai[6]和 Chu 等[24]研究结果一致。其中，M_2N_2 处理在一定程度上可维持不同土层 AOB 多样性指数。其原因可能是长期施氮肥降低土 pH(表 1)，导致 AOB 群落结构多样性降低。施用有机肥可通过维持土壤 pH，进而稳定 AOB 群落结构多样性。另外，由于施入土壤中的氮素不同，氮素种类与含量的差异，也可能是导致 AOB 在土壤中分布差异的原因[22]。

研究不同土层 AOB 群落结构多样性表现为，除 M_2N_2 处理外，所有处理 0~20 cm 土层 AOB 多样性指数显著高于 20~40 cm 和 40~60 cm 土层，M_2N_2 处理不同土壤深度差异不明显。究其原因应是，0~20 cm 土层中可利用资源较为丰富、氧气相对充足，微生物群落之间的竞争关系差，所以对在数量上不占优势的功能群落影响较小，致使多样性指数较高。随着土壤深度增加，生态环境难以满足土壤中 AOB 的生长需求，微生物多样性指数降低。有机肥配施方式有助于增加各土层中多种养分供应，AOB 能够很好地利用土壤中养分，与其他种群竞争，进而增加种群多样性[25]。

4 结论

研究结果表明，长期定位施肥可显著降低 0~20 cm 土壤 pH，提高土壤铵态氮、硝态氮含量，土壤硝化强度则变化不明显。土壤中 AOB 的数量和群落结构多样性受施肥方式显著影响，并表现出明显的垂直分布特征。其中，土壤中增施氮肥可提高 AOB 的丰度，降低细菌丰度。土壤中 AOB 多样性指数均在表土层(0~20 cm)最高，增施氮肥则显著降低 AOB 的多样性。有机与无机肥配施不仅有助于改善土壤酸化现象，并可稳定不同深度土壤中 AOB 种群多样性。长期施肥棕壤中，硝态氮含量是影响 AOB 群落结构多样性的重要因子。

参考文献 References

[1] LI Y Y, CHAPMAN S J, NICOL G W, et al. Nitrification and nitrifiers in acidic soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 116: 290–301

[2] CHEN X, ZHANG L M, SHEN J P, et al. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in an acid paddy soil[J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(3): 323–331

[3] WU Y C, LU L, WANG B Z, et al. Long-term field fertilization significantly alters community structure of ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea in a paddy soil[J]. Soil Science Society of America Journal, 2011, 75(4): 1431–1439

[4] HAYATSU M, TAGO K, UCHIYAMA I, et al. An acid-tolerant ammonia-oxidizing γ-proteobacterium from soil[J]. The ISME Journal, 2017, 11(5): 1130–1141

[5] 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, 62(4): 982–990

[6] AI C, LIANG G Q, SUN J W, et al. Different roles of rhizosphere effect and long-term fertilization in the activity and community structure of ammonia oxidizers in a calcareous fluvo-aquic soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 57: 30–42

[7] KUMAR U, SHAHID M, TRIPATHI R, et al. Variation of functional diversity of soil microbial community in sub-humid tropical rice-rice cropping system under long-term organic and inorganic fertilization[J]. Ecological Indicators, 2017, 73: 536–543

[8] LIU H Y, LI J, ZHAO Y, et al. Ammonia oxidizers and nitrite-oxidizing bacteria respond differently to long-term manure application in four paddy soils of south of China[J]. Science of the Total Environment, 2018, 633: 641–648

[9] OUYANG Y, REEVE J R, NORTON J M. Soil enzyme activi-

ties and abundance of microbial functional genes involved in nitrogen transformations in an organic farming system[J]. Biology and Fertility of Soils, 2018, 54(4): 437–450

[10] ZHAO J, NI T, LI Y, et al. Responses of bacterial communities in arable soils in a rice-wheat cropping system to different fertilizer regimes and sampling times[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85301

[11] 赵爽, 胡江, 沈其荣. 两个水稻品种根际土壤细菌和氨氧化细菌的群落结构差异[J]. 土壤学报, 2010, 47(5): 939–945
ZHAO S, HU J, SHEN Q R. Difference in community structure of bacteria and ammonia-oxidizing bacteria in rhizosphere between two different rice cultivars[J]. Acta Pedologica Sinica, 2010, 47(5): 939–945

[12] WANG L, LI T. Effects of seasonal temperature variation on nitrification, anammox process, and bacteria involved in a pilot-scale constructed wetland[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(5): 3774–3783

[13] MA Y X, TAO W, LIU J, et al. Response of ammonia-oxidizing betaproteobacteria to short-term fertilization in a salt marsh in China[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2018, 36(2): 351–361

[14] FOTIDIS I A, TREU L, ANGELIDAKI I. Enriched ammonia-tolerant methanogenic cultures as bioaugmentation inocula in continuous biomethanation processes[J]. Journal of Cleaner Production, 2017, 166: 1305–1313

[15] 黄鑫, 杨弢, 吴昊, 等. 成都老官山汉墓出土竹简饱水保存期间的细菌群落结构[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(3): 493–499
HUANG X, YANG T, WU H, et al. Bacterial community structure in waterlogged bamboo slips excavated from the Laoguanshan Han Dynasty Tomb of Chengdu[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2018, 24(3): 493–499

[16] GARCIAS-BONET N, ARRIETA J M, DE SANTANA C N, et al. Endophytic bacterial community of a Mediterranean marine angiosperm (*Posidonia oceanica*)[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 342

[17] 杨亚东, 张明才, 胡君蔚, 等. 施氮肥对华北平原土壤氨氧化细菌和古菌数量及群落结构的影响[J]. 生态学报, 2017, 37(11): 3636–3646
YANG Y D, ZHANG M C, HU J W, et al. Effects of nitrogen fertilizer application on abundance and community structure of ammonia oxidizing bacteria and archaea in a North China agricultural soil[J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(11): 3636–3646

[18] WANG J C, ZHANG L, LU Q, et al. Ammonia oxidizer abundance in paddy soil profile with different fertilizer regimes[J]. Applied Soil Ecology, 2014, 84: 38–44

[19] XIA W W, ZHANG C X, ZENG X W, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil[J]. The ISME Journal, 2011, 5(7): 1226–1236

[20] TAGO K, OKUBO T, SHIMOMURA Y, et al. Environmental factors shaping the community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in sugarcane field soil[J]. Microbes and environments, 2015, 30(1): 21–28

[21] YAO H Y, CAMPBELL C D, CHAPMAN S J, et al. Multi-factorial drivers of ammonia oxidizer communities: Evidence from a national soil survey[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(9): 2545–2556

[22] 李晨华, 张彩霞, 唐立松, 等. 长期施肥土壤微生物群落的剖面变化及其与土壤性质的关系[J]. 微生物学报, 2014, 54(3): 319–329
ZHANG C H, ZHANG C X, TANG L S, et al. Effect of long-term fertilizing regime on soil microbial diversity and soil property[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(3): 319–329

[23] 李晨华, 贾仲君, 唐立松, 等. 不同施肥模式对绿洲农田土壤微生物群落丰度与酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2012, 49(3): 567–574
LI C H, JIA Z J, TANG L S, et al. Effect of model of fertilization on microbial abundance and enzyme activity in oasis farmland soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2012, 49(3): 567–574

[24] CHU H Y, FUJII T, MORIMOTO S, et al. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(2): 485–491

[25] ZHANG Q, LIANG G Q, MYROLD D D, et al. Variable responses of ammonia oxidizers across soil particle-size fractions affect nitrification in a long-term fertilizer experiment[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 105: 25–36