

ISSN 0564-3929

# Acta Pedologica Sinica 土壤学报

Turang Xuebao



中国土壤学会  
科学出版社

主办  
出版

2015

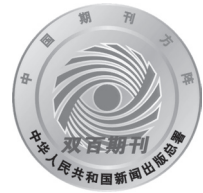
第 52 卷 第 4 期

Vol.52 No.4



# 土壤学报

(Turang Xuebao)



第 52 卷 第 4 期 2015 年 7 月

## 目 次

### 综述与评论

亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化微生物生态学研究进展····· 沈李东 (713)

### 土壤科学与现代农业

近30年江西省耕地土壤全氮含量时空变化特征····· 赵小敏 邵 华 石庆华等 (723)

北京市土壤重金属潜在风险预警管理研究····· 蒋红群 王彬武 刘晓娜等 (731)

秸秆深还对土壤团聚体中胡敏酸结构特征的影响····· 朱 姝 窦 森 陈丽珍 (747)

生物炭添加对酸化土壤中小白菜氮素利用的影响····· 俞映惊 薛利红 杨林章等 (759)

水肥对高产无性系油茶果实产量的影响····· 张文元 郭晓敏 涂淑萍等 (768)

### 研究论文

基于VRML的土壤电导率三维空间变异性虚拟现实建模研究····· 李洪义 顾呈剑 但承龙等 (776)

不同样点数量对土壤有机质空间变异表达的影响····· 海 南 赵永存 田 康等 (783)

基于稳定同位素的土壤水分运动特征····· 靳宇蓉 鲁克新 李 鹏等 (792)

中国玉米区域氮磷钾肥推荐用量及肥料配方研究····· 吴良泉 武 良 崔振岭等 (802)

不同施肥方式下滩涂围垦农田土壤有机碳及团聚体有机碳的分布····· 候晓静 杨劲松 王相平等 (818)

长期施肥对浙江稻田土壤团聚体及其有机碳分布的影响····· 毛霞丽 陆扣萍 何丽芝等 (828)

不同时期施用生物炭对稻田N<sub>2</sub>O和CH<sub>4</sub>排放的影响····· 李 露 周自强 潘晓健等 (839)

秸秆生物炭对潮土作物产量和土壤性状的影响····· 刘 园 M. Jamal Khan 靳海洋等 (849)

单一电解质体系下恒电荷土壤胶体扩散双电层中滑动层厚度的计算····· 丁武泉 朱启红 王 磊等 (859)

化工厂遗留地铬污染土壤化学淋洗修复研究····· 李世业 成杰民 (869)

离子型稀土矿尾砂地植被恢复障碍因子研究····· 刘文深 刘 畅 王志威等 (879)

辽东与山东半岛土壤中有机氯农药残留特征研究····· 朱英月 刘全永 李 贺等 (888)

长期冬种绿肥改变红壤稻田土壤微生物生物量特性····· 高嵩涓 曹卫东 白金顺等 (902)

豆科间作对番茄产量、土壤养分及酶活性的影响····· 代会会 胡雪峰 曹明阳等 (911)

### 研究简报

蚕豆根系分泌物中氨基酸含量与枯萎病的关系····· 董 艳 董 坤 汤 利等 (919)

小麦与蚕豆间作对根际真菌代谢功能多样性的影响····· 胡国彬 董 坤 董 艳等 (926)

不同年限毛竹林土壤固氮菌群落结构和丰度的演变····· 何冬华 沈秋兰 徐秋芳等 (934)

长期不同施肥模式下砂姜黑土的固碳效应分析····· 李 玮 孔令聪 张存岭等 (943)

果园生草对<sup>15</sup>N利用及土壤累积的影响····· 彭 玲 文 昭 安 欣等 (950)

封面图片: 离子型稀土矿废弃地全景 (由汤叶涛、刘文深提供)

DOI: 10.11766/trxb201408070397

# 不同年限毛竹林土壤固氮菌群落结构和丰度的演变\*

何冬华 沈秋兰 徐秋芳<sup>†</sup> 陈俊辉 程敏 毛新伟 李永春

(浙江农林大学环境与资源学院, 浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室, 浙江临安 311300)

**摘要** 应用变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 和荧光定量 PCR (real time fluorescent quantitative PCR, qPCR) 方法研究了不同年限毛竹林土壤固氮菌群落结构和丰度的变化。结果表明: 土壤 pH、有机质、有效磷、速效钾和铵态氮含量在马尾松林改造成毛竹林 5 a 后明显提高, 而后逐渐降低, 并趋于稳定; 土壤固氮菌多样性和 *nifH* 基因丰度也呈现相似的趋势。条带测序分析表明, 毛竹林土壤固氮菌均为不可培养的固氮菌, 与慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium* sp.) 具有较高的相似度。冗余分析结果表明, 不同栽培年限毛竹林地土壤固氮菌群落组成发生了明显变化, 长期栽培毛竹林引起的土壤养分变化对土壤固氮菌多样性具有重要影响。

**关键词** 毛竹林; *nifH* 基因; 多样性; 变性梯度凝胶电泳

**中图分类号** S714.3 **文献标识码** A

氮素是影响植物生长的关键大量营养元素, 也是决定生态系统物种组成的主要因子。生物固氮是氮进入生态系统的重要途径之一, 也是森林土壤中氮素供应的重要来源<sup>[1-2]</sup>。系统发育上具有生物固氮能力的原核生物, 是生态系统中一类重要的功能菌群, 其数量和群落结构的变化直接影响着土壤固氮效率高低和土壤氮素循环的正常运转<sup>[3]</sup>。这类固氮菌体内存在一种具有催化功能的固氮酶, 其中由 *nifH* 固氮基因编码的钼铁蛋白和铁蛋白固氮酶系统具有极强的固氮活性。*nifH* 基因具有高度保守性, 已被广泛用作研究环境中固氮菌群落结构的标记基因<sup>[4]</sup>。

毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 林是我国南方一类典型的森林资源类型, 占全国竹林面积的 70% 左右<sup>[5]</sup>, 毛竹适生性广, 生长速度快, 具有重要的经济效益和生态效益。近年来, 一些地区大力发展毛竹产业, 毛竹林面积不断扩大。毛竹生长对氮素需求量极大, 而我国竹林土壤的氮含量相对于林分生长需求来说较为匮乏<sup>[6]</sup>, 对于不施肥料的粗放经营竹林而言, 生物固氮是维持毛竹生长的最主要

氮源, 因此在粗放经营条件下生物固氮对林地氮素供应就显得尤为重要。天然林被改造成毛竹林后植被群落结构发生明显变化, 生物多样性下降<sup>[7]</sup>, 长期粗放经营导致毛竹林养分衰退<sup>[8]</sup>、生产力下降<sup>[9]</sup>、土壤微生物群落结构发生改变<sup>[10]</sup>、从而影响毛竹林的可持续发展及生态经济效益等系列问题值得重视。因此, 研究不同栽培年限毛竹林土壤固氮菌群落丰度和结构的演变特征及其影响因素对于了解林地土壤生物固氮状况和改善土壤氮素供应具有深远意义。

毛竹林生态系统的固氮作用由土壤中的自生固氮菌和毛竹内部的联合固氮菌两部分组成, 本研究着重研究土壤中自生固氮菌特征。利用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 和荧光定量 PCR (Real time fluorescent quantitative PCR, qPCR) 技术, 研究毛竹纯林粗放经营过程中土壤固氮菌 *nifH* 基因的丰度及其群落结构的演变规律, 为长期可持续经营毛竹林提供理论依据。

\* 国家自然科学基金项目 (编号: 41271274) 资助

<sup>†</sup> 通讯作者, E-mail: xuqiufang@zafu.edu.cn

作者简介: 何冬华 (1988—), 男, 湖南郴州人, 硕士研究生, 主要从事土壤生物与生物化学研究。E-mail: zjnlxdxhdh@163.com

收稿日期: 2014-08-07; 收到修改稿日期: 2014-11-11

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区概况

试验地位于浙江省湖州市安吉县境内 (30°52' ~ 30°23' N, 119°53' ~ 119°14' E), 该地属于北亚热带季风气候, 年平均气温15 °C, 年均降水量1 485 mm, 年均日照时数2 005 h,  $\geq 10$  °C的积温4 934 °C, 无霜期226 d。毛竹林栽培区属低山丘陵地貌, 土壤母质为粉砂和细砂混合岩。研究区内毛竹林由马尾松林 (*Pinus massoniana*) 改造而成, 以粗放经营为主, 刚种植毛竹时施用化肥, 之后均未施肥。于2013年10月选择不同栽培年限的粗放经营毛竹林地进行调研。

### 1.2 样品采集与处理

按照生态控制原则和根据实际生产情况, 选择4个不同栽培年限的毛竹林: 5YR (营造年份为2008年)、9YR (营造年份为2004年)、15YR (营造年份为1998年) 和18YR (营造年份为1995 a), 同时选择种植毛竹前立地条件相似的马尾松林作为对照 (CK), 共计5个处理。采样方法: 分别在每个种植区建立10 m × 10 m标准地各3个, 在每个标准样地中按一定距离设置3个采样点。去除表层落叶等杂物后采集0 ~ 20 cm土壤样品, 3份土壤样品充分混合成为一个样品。样品混匀后过2 mm筛, 按四分法分成两份分别装入无菌塑料袋, 置于冰上带回实验室。一份风干后用于土壤理化性质分析, 另一份样品冷冻干燥后置于-70 °C保存, 用于核酸提取。

### 1.3 分析方法

土壤化学性质分析: 土壤化学性质分析参照文献 [11] 进行。其中, 土壤pH测定采用1 : 2.5土水质量比, 用酸度计测定 (Mettler Toledo Seveneasy, Sweden); 有机质含量用重铬酸钾容量法; 碱解氮采用碱解扩散法; 土壤硝态氮和铵态氮分别采用KCl浸提—紫外分光光度法和KCl浸提—靛酚蓝比色法; 有效磷采用盐酸-氟化铵溶液浸提—钼锑抗比色法测定; 速效钾采用醋酸铵提取—火焰光度计测定。

土壤总DNA的提取: 采用PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio, USA) 试剂盒提取土壤总DNA, 操作方法按试剂盒说明书进行, 提取的DNA片段大小经1% (质量体积比) 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并用微量分光光度计进行浓度测定

(NanoDrop ND-1000 spectrophotometer, USA)。

*nifH*基因片段变性梯度凝胶电泳 (DGGE): 采用巢式PCR扩增土壤样品中的*nifH*基因<sup>[1]</sup>。第一轮PCR扩增, 使用正向引物FGPH19<sup>[12]</sup>和反向引物PoIR<sup>[13]</sup>扩增片段长度约为429 bp。以第一轮PCR产物为模板进行第二轮PCR扩增, 使用正向引物PoIF和反向引物AQER<sup>[13]</sup>, 得到320 bp (包括GC夹序列) 的扩增产物, 其中PoIF在5'端加一段GC夹<sup>[1]</sup>。25  $\mu$ l反应体系如下: 12.5  $\mu$ l 10 × Premix Taq, 引物 (10  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) 各0.25  $\mu$ l, 模板DNA 0.3  $\mu$ l, Bovine Serum Albumin (BSA, 20 mg mL<sup>-1</sup>) 0.2  $\mu$ l, 用无菌双蒸水补足至25  $\mu$ l。扩增程序为: 94 °C变性1 min, 退火1 min (第一轮PCR退火温度55 °C, 第二轮PCR退火温度为48 °C), 72 °C延伸2 min, 30个循环, 最后72 °C延伸5 min。反应设置不加模板的阴性对照组, PCR产物经1.5% (m/v) 琼脂糖凝胶电泳检测后用于DGGE分析。

使用D-Code™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, USA) 进行DGGE分析, 在浓度为8%的聚丙烯酰胺和变性梯度为40% ~ 65%的凝胶上进行电泳 (100%变性胶含有7 mol L<sup>-1</sup>尿素和40% (体积比) 去离子甲酰胺)。取10  $\mu$ l第二轮PCR产物与10  $\mu$ l 6 × loading buffer混匀后用微量进样器进样, 在60 °C和80 V条件下电泳13 h。电泳结束后, 凝胶经SYBR green I (1 : 10 000) 染料染色30 min后于Gel Doc™ EQ凝胶成像系统 (Bio-Rad, USA) 拍照保存, 并利用Quantity One 4.6.2 (Bio-Rad, USA) 软件进行数字化分析。

DGGE条带测序和系统发育分析: 用无菌手术刀将DGGE图谱中的主要类型条带进行切胶回收, 以不带GC夹的第二轮引物进行扩增。将确定为单一条带的PCR产物用纯化试剂盒 (TaKaRa, Japan) 纯化后与载体pEASY-T3连接, 转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109中, 检测阳性克隆, 阳性克隆送至上海生工生物技术公司进行测序。测序结果在NCBI上进行Blast比对分析, 获取相近序列。用Mega 4.0中的邻接法 (Neighbor-joining) 建立固氮菌*nifH*基因的系统发育树。DGGE图谱得到的20条*nifH*基因序列提交GenBank (NCBI) 数据库, 得到序列号为KM401607 ~ KM401626。

固氮菌*nifH*基因定量PCR: 以提取的土壤总

DNA作为模板, AQER和PolF为引物<sup>[13]</sup>, 采用实时荧光定量PCR (qPCR) 法测定固氮菌*nifH*基因拷贝数。20  $\mu$ l反应体系组成如下: 2  $\times$  SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 10  $\mu$ l, 50  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>上游和下游引物各0.2  $\mu$ l, 模板DNA 1  $\mu$ l, 无菌双蒸水8.6  $\mu$ l, 每个样品3次重复, 荧光定量PCR扩增在CFX 96<sup>TM</sup> Real-Time System (Bio-Rad, USA) 仪器上进行, 荧光定量PCR程序参照文献[14]。标准曲线制作: 将测序获得的已知种属的阳性克隆子扩增培养后提取质粒DNA, 微量分光光度计检测其浓度和纯度 (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) 后, 将重组质粒10倍梯度稀释 (10<sup>-3</sup> ~ 10<sup>-8</sup>), 每个梯度3个重复, 作为*nifH*基因的荧光定量的标准样品, 反应程序和反应体系同上所述。扩增效率86%, 决定系数 ( $R^2$ ) 0.999。

#### 1.4 数据处理

DGGE图谱经Quantity One软件数字化, 并采用Shannon多样性指数 ( $H$ )、丰富度指数 ( $D$ ) 以及均匀度指数 ( $E$ ) 对土壤固氮菌*nifH*多样性进行分析<sup>[15]</sup>, 其计算公式分别为:

$$H = -\sum(n_i/N)\ln(n_i/N) \quad (1)$$

$$D = (S - 1) / \ln N \quad (2)$$

$$E = H / \ln S \quad (3)$$

式(1~3)中,  $n_i$ 为每条电泳条带光密度峰值,  $N$ 为同一泳道中所有条带光密度峰值总和,  $S$ 为每一泳道总的条带数, 电泳条带光密度峰值通过Quantity One 软件获取。

使用CANOCO4.5软件 (Microcomputer

Power, Ithaca, USA) 对DGGE结果揭示的固氮菌群落结构结合环境参数进行冗余分析 (Redundancy analysis, RDA); 相关性分析采用Pearson法。

## 2 结果

### 2.1 不同年限毛竹林土壤化学性质与固氮菌丰度的关系

不同栽培年限毛竹林土壤样品的理化性质结果见表1, 不同栽培年限土壤理化性质发生了较大改变。天然马尾松林改种毛竹后土壤pH增加, 随着栽培年限的增加土壤pH先上升后下降, 种植9 a时达到最大, 之后逐渐下降。土壤有机质、有效磷、速效钾和铵态氮含量的变化规律与土壤pH相似, 但达到最大值的时间是种植5 a的土壤; 碱解氮、硝态氮含量则随着栽培年限的增加呈下降趋势, 至18 a达到最低值。

不同栽培年限毛竹林土壤*nifH*基因的拷贝数介于 $5.22 \times 10^6 \sim 1.89 \times 10^7$  copies g<sup>-1</sup>干土之间。马尾松林改种为毛竹林初期 (5YR) 土壤固氮菌数量大幅度增加, 增幅达152%, 之后土壤固氮菌数量下降, 处理9YR时最低, 之后固氮菌数量呈回升的趋势, 15YR和18YR处理土壤固氮菌数量已回到CK水平。相关性分析发现*nifH*基因数量与速效钾 ( $r=0.80$ ,  $p<0.01$ ,  $n=15$ ) 和有机质 ( $r=0.84$ ,  $p<0.01$ ,  $n=15$ ) 的含量呈极显著正相关性, 与铵态氮的含量呈显著正相关性 ( $r=0.53$ ,  $p<0.05$ ,  $n=15$ )。

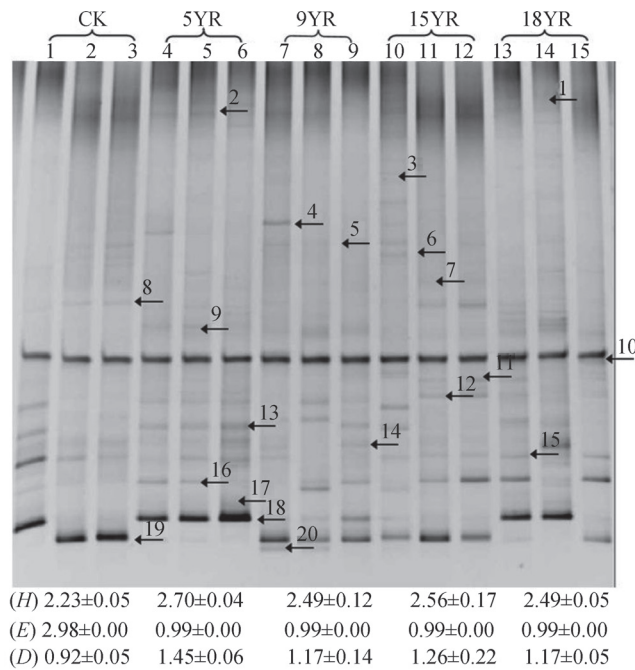
表1 不同年限毛竹林土壤化学性质和固氮菌的数量

处理		有机质	碱解氮	有效磷	速效钾	硝态氮	铵态氮	固氮菌数量
Treatment	pH (H <sub>2</sub> O)	Organic matter	Alkalytic N	Available P	Readily available K	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	population size of <i>nifH</i> gene
		(g kg <sup>-1</sup> )	(mg kg <sup>-1</sup> )	(mg kg <sup>-1</sup> )	(mg kg <sup>-1</sup> )	(mg kg <sup>-1</sup> )	(mg kg <sup>-1</sup> )	( $\times 10^6$ copies g <sup>-1</sup> dry soil)
CK	4.51 $\pm$ 0.05	43.28 $\pm$ 2.18	137.1 $\pm$ 42.7	0.64 $\pm$ 0.15	40.0 $\pm$ 7.2	56.92 $\pm$ 15.55	11.65 $\pm$ 2.18	7.49 $\pm$ 1.94
5YR	4.61 $\pm$ 0.08	57.84 $\pm$ 1.60	102.2 $\pm$ 3.9	1.97 $\pm$ 0.41	67.0 $\pm$ 8.2	48.16 $\pm$ 4.40	14.14 $\pm$ 0.91	18.9 $\pm$ 1.41
9YR	4.88 $\pm$ 0.15	35.75 $\pm$ 1.25	93.12 $\pm$ 3.68	1.95 $\pm$ 0.43	41.0 $\pm$ 5.0	42.30 $\pm$ 1.31	10.69 $\pm$ 2.78	5.22 $\pm$ 1.12
15YR	4.71 $\pm$ 0.12	41.87 $\pm$ 2.13	93.95 $\pm$ 20.41	1.49 $\pm$ 0.85	45.7 $\pm$ 3.2	42.40 $\pm$ 3.60	12.77 $\pm$ 2.70	9.12 $\pm$ 1.47
18YR	4.63 $\pm$ 0.06	35.01 $\pm$ 4.22	70.15 $\pm$ 5.13	1.23 $\pm$ 0.25	44.7 $\pm$ 5.9	41.51 $\pm$ 0.82	9.36 $\pm$ 3.91	6.98 $\pm$ 1.27

## 2.2 土壤固氮菌 *nifH* 基因 DGGE 分析

从图1中可以看出，随着毛竹林栽培年限的延长，不同处理固氮菌 DGGE 图谱的条带数、条带位置和亮度存在一定程度的差异。DGGE 图谱显示所有的土壤样品共有 20 条位置不同的条带，5YR 处理条带最丰富，多样性指数和丰富度指数（图1下方数据）也最高；9YR、15YR 和 18YR 处理多样性指数和丰富度指数低于 5YR，但明显高于 CK 处理（仅有 10 条条带）。条带 10、18 和 19 为优势固氮菌类群，随毛竹林栽培变化差异较大。其中，条带 10 较稳定，而条带 18 在 5YR 时为主导类群，在 9YR 和 15YR 时亮度减少明显，至

18YR 时又恢复；与之相反，条带 19 在 CK 中为主导，而在 5YR 和 18YR 消失。一些非优势条带，如条带 5 和 6 在改种初期（5YR）消失，但是出现了一些新的条带，如 7、9 和 11。随着毛竹林粗放经营时间增加，条带 8 和 11 在 9 a 消失，但在 18 a 后又恢复；条带 16 在后期亮度提高，说明毛竹栽培对其产生了一定的影响；从图1中也可看出：5YR 和 9YR 样品的固氮菌群落结构在第一排序轴上与 CK 距离较远，而 15YR 和 18YR 样品与对照相距较近，表明毛竹栽培对林地土壤固氮菌群落结构产生了较大的影响，而长期栽培后差异有所降低。



注：多样性指数（*H*, *E*, *D*）。*H*, Shannon 指数；*E*, 均匀度指数；*D*, 丰富度指数；AN, 碱解氮；AP, 有效磷；AK, 速效钾；OM, 有机质；NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N, 硝态氮；NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, 铵态氮

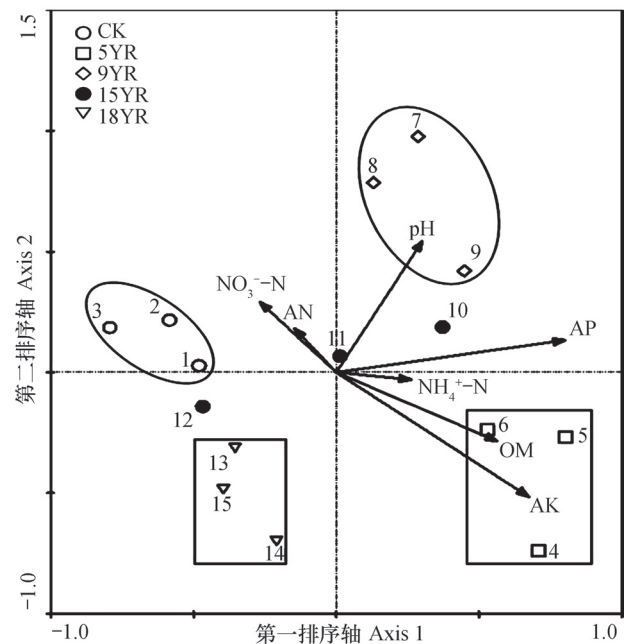
Note: Diversity indices (*H*, *E*, *D*). *H*, Shannon index; *E*, Evenness; *D*, Richness; AN, Alkalytic N; AP, Available P; AK, Readily available K; OM, Organic matter

图1 不同年限毛竹林土壤固氮菌群落 *nifH* 基因的 DGGE 图谱和固氮菌群落结构的冗余分析

Fig. 1 DGGE fingerprinting of the *nifH* genes of nitrogen-fixing bacteria in the moso bamboo stands and redundancy analysis of their community structures relative to age of the stand

冗余分析（Redundancy analysis, RDA）显示（图1）：第一排序轴（Axis 1）和第二排序轴（Axis 2）分别解释了样本中 24.1% 和 22.5% 的变异，两者共解释了样本 46.6% 的总变异，7 个环境因子中速效钾 AK（ $p=0.002$ ）和有效磷 AP（ $p=0.004$ ），有机质 OM（ $p=0.016$ ）和 pH（ $p=0.034$ ）对土壤固氮菌群落的影响分别达极显

著（ $p<0.01$ ）和显著（ $p<0.05$ ）水平，硝态氮、铵态氮与碱解氮对群落结构的影响较小，未达显著水平（ $p>0.05$ ）。其中，土壤有机质和速效钾对 5YR 毛竹林地土壤固氮菌影响最大，引起了优势条带 18 出现而条带 19 消失；土壤 pH 则对 9YR 和 15YR 毛竹林地土壤固氮菌影响最大，其中对亮度逐渐降低的优势条带 19 有较大作用；而有效磷则对 5YR、9YR

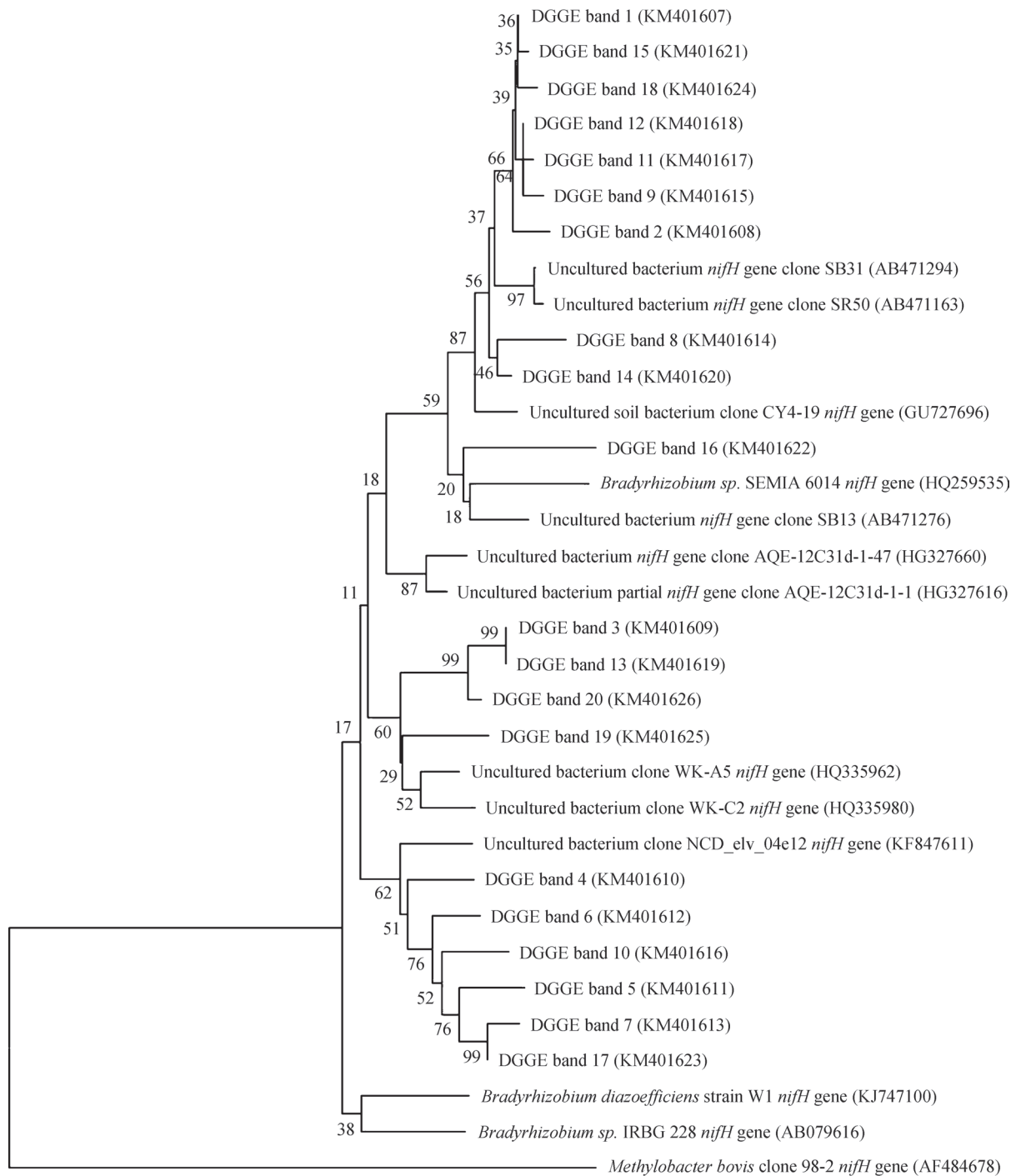


和15YR毛竹林地土壤固氮菌均有影响。

### 2.3 土壤固氮菌 *nifH* 基因测序及系统发育分析

将DGGE图谱中标识的条带进行切胶回收测序，将测序结果与NCBI比对后构建系统发育树（图2）。本研究得到的序列均与GenBank中不

可培养的固氮菌 *nifH* 基因片段具有较高的相似度（93%~98%），而这些序列又与 $\alpha$ -变形菌纲的慢生根瘤菌（*Bradyrhizobium* sp.）具有较近的亲缘关系，与 $\gamma$ -变形菌纲的同样具有 *nifH* 基因的 *Methylobacter* sp. 亲缘关系较远。



0.05

标尺长度为5%的核苷酸置换率，分支点数字代表步长值（基于1 000次重复）

The scale bar: 5% nucleotide substitution rate. Numbers at branch points are percentage bootstrap ( values based on 1 000 replicates )

图2 DGGE图谱条带 *nifH* 基因的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the *nifH* gene clones from DGGE profile with the closest known relatives obtained from GeneBank ( NCBI )

### 3 讨 论

粗放经营过程中不同栽培年限毛竹林土壤固氮菌 *nifH* 的数量与种群结构变化规律具有相似性。与马尾松林相比, *nifH* 基因数量在改种毛竹林初期 (5YR) 显著提高, 表明毛竹林栽培前期阶段对提高固氮菌丰度效果较好, 有利于固氮菌的生长。这可能是由于毛竹林生长初期土壤较高的有机质含量和旺盛的根系分泌物为固氮菌的生长提供了更多的碳源和养分。然而, 随着栽培时间的延长, 栽培 9 a 时固氮菌数量又急剧降低, 随后逐渐稳定, 这可能是毛竹作为一种土壤养分消耗较高的物种, 随着栽培时间的延长, 养分指标均呈下降趋势, 其自身的养分循环, 如凋落物分解和有机碳固定, 并不能满足土壤自肥的要求<sup>[16]</sup>, 以上结果表明长期粗放经营毛竹林可降低固氮菌丰度。已有研究表明, 土壤中固氮菌的丰度与土壤碳含量和土壤养分, 如有效磷、速效钾等密切相关<sup>[17-18]</sup>。微生物固氮需要足够的能量, 固氮菌每固定一分子氮至少需要约 16 个 ATP, 而有机碳通常是其主要能量来源<sup>[19]</sup>。本研究发现, 栽培后期毛竹林地土壤各项养分指标均有不同程度的降低, 可能一定程度上限制了异养固氮菌的生长。相关性分析显示 *nifH* 基因数量与有机质和速效钾含量呈极显著正相关性, 进一步表明毛竹林土壤养分含量的降低直接影响了固氮菌的丰度。

为进一步揭示特定环境因子变化和固氮菌群落结构的内在联系, 本研究采用冗余分析就文中的 7 个环境因子对不同栽培年限毛竹林土壤固氮菌群落结构的影响进行了探讨, RDA 分析结果表明土壤有效磷、速效钾和有机质及 pH 是影响固氮菌群落结构的主导因素。这与 Zou 等<sup>[20]</sup> 研究报道的 pH、有效磷对固氮菌区系的影响显著 ( $p < 0.05$ ) 结果较为一致, 而且这 2 个土壤理化因子之间存在显著的相关性, 进一步说明固氮菌群落结构可由多个环境因子共同控制。董志新等<sup>[21]</sup> 通过黑土和潮土固氮菌群落多样性研究发现土壤固氮菌多样性与土壤有效磷、速效钾和有机质呈正相关, 而与 pH 呈负相关。可见, 有效磷、速效钾和有机质及 pH 的变化对土壤固氮菌群落结构影响较大, 这些环境因子及其相互作用对改变林地土壤固氮菌生长环境和活性具有重要作用。因此, 长期栽培毛竹引起的土壤养

分含量的变化是导致固氮菌群落结构变异的重要因素, 粗放经营过程应合理控制养分的输入和输出, 防止土壤养分流失。本研究进一步发现, 固氮菌丰度与土壤无机氮 (硝态氮与铵态氮) 含量和无机氮与碱解氮的总量均无显著相关性, 说明影响固氮菌群落结构变化的机制较为复杂。

系统发育结果表明, 不同栽培年限毛竹林土壤固氮菌群落结构由  $\alpha$ -变形菌纲的不可培养固氮菌组成, 与慢生根瘤菌属具有较近的亲缘关系但又不完全相同, 可能是该地区特有的。本研究结果与 Röscher 等<sup>[22]</sup> 报道的  $\alpha$ -变形菌纲固氮菌在酸性土壤中占优势结果一致, 但未发现含固氮功能的蓝藻菌门。与此相似, 文都日乐等<sup>[23]</sup> 研究也发现呼伦贝尔草原土壤固氮菌大部分属于变形菌门的  $\alpha$ -变形菌纲, 且慢生根瘤菌属是主导菌群。因此, 与慢生根瘤菌亲缘关系较近的这些固氮菌在反映该地区土壤环境变化和提供毛竹林土壤氮素供应中起了重要的作用。此外, 本研究结果也发现个别处理重复性较差, 如 CK 和 15YR 样地各有一个离群样品, 可能与林地土壤异质性较大有关。不同样点间局部植被和环境的差异可能引发土壤微生物性质差异<sup>[24]</sup>, 在后续的研究中有必要增加重复样品采集数量, 提高样品的代表性。

### 4 结 论

本研究表明, 马尾松林改种毛竹林后显著提高了土壤固氮菌群落多样性和丰度, 而随着栽培年限的延长固氮菌的群落结构差异减小, 多样性和丰度逐渐降低。长期粗放经营降低了土壤养分含量, 是导致土壤中固氮菌群落改变和数量减少的重要因素。因此, 必须采取合理的方式维持碳源含量和养分的平衡, 以保持微生物的多样性, 促进竹林可持续发展。然而, 长期的毛竹栽培和经营措施对土壤固氮菌群落和活性的影响还有待于进一步的研究。

### 参 考 文 献

- [1] Diallo D M, Willems A, Vloemans N, et al. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the  $N_2$ -fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* and *balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environmental Microbiology*, 2004, 6 (4): 400—415



- [ 2 ] Wartainen I, Eriksson T, Zheng W, et al. Variation in the active diazotrophic community in rice paddy *nifH* PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Applied Soil Ecology*, 2008, 39 ( 1 ) : 65—75
- [ 3 ] 张晶, 张惠文, 苏振成, 等. 长期有机污水灌溉对土壤固氮细菌种群的影响. *农业环境科学学报*, 2007, 26 ( 2 ) : 662—666. Zhang J, Zhang H W, Su Z C, et al. The effect of long-term wastewater irrigation on the soil nitrogen-fixing bacteria population ( In Chinese ). *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26 ( 2 ) : 662—666
- [ 4 ] Young J P W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms//Stacey G, Evans H J, Burris R H. *Biological nitrogen fixation*. New York: Chapman and Hall, 1992: 43—86
- [ 5 ] 漆良华, 刘广路, 范少辉, 等. 不同抚育措施对闽西毛竹林碳密度、碳贮量与碳格局的影响. *生态学杂志*, 2009, 28 ( 8 ) : 1482—1488. Qi L H, Liu G L, Fan S H, et al. Effects of different tending measures on carbon density, storage, and allocation pattern of *Phyllostachy edulis* forests in western Fujian Province ( In Chinese ). *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28 ( 8 ) : 1482—1488
- [ 6 ] 林华. 固氮植物对竹林土壤条件的改善作用. *林业科技开发*, 2002, 16 ( 6 ) : 17—19. Lin H. The effects of nitrogen-fixing plants on soil conditions improvement in *Phyllostachy edulis* ( In Chinese ). *China Forestry Science and Technology*, 2002, 16 ( 6 ) : 17—19
- [ 7 ] 杨淑贞, 杜晴洲, 陈建新, 等. 天目山毛竹林蔓延对鸟类多样性的影响研究. *浙江林业科技*, 2008, 28 ( 4 ) : 43—46. Yang S Z, Du Q Z, Chen J X, et al. Effect of *Phyllostachys heterocyclus* var. *pubescens* spreading on bird diversity ( In Chinese ). *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology*, 2008, 28 ( 4 ) : 43—46
- [ 8 ] 楼一平, 吴良如, 李瑞成, 等. 竹木混交林改为毛竹纯林经营后的林分生长动态. *林业科学研究*, 1997, 10 ( 1 ) : 35—41. Lou Y P, Wu L R, Li R C, et al. Growth dynamics of pure *Phyllostachys pubescens* stands transformed from mixed stands ( In Chinese ). *Forest Research*, 1997, 10 ( 1 ) : 35—41
- [ 9 ] 刘恩斌, 施拥军, 李永夫, 等. 浙江毛竹林非空间结构特征及其动态变化. *林业科学*, 2013, 49 ( 9 ) : 1—7. Liu E B, Shi Y J, Li Y F, et al. Non spatial structural characteristic of moso bamboo forest and its dynamics in Zhejiang Province ( In Chinese ). *Scientia Silvae Sinicae*, 2013, 49 ( 9 ) : 1—7
- [ 10 ] 孙棣棣, 徐秋芳, 田甜, 等. 不同栽培历史毛竹林土壤微生物生物量及群落组成变化. *林业科学*, 2011, 47 ( 7 ) : 181—186. Sun D D, Xu Q F, Tian T, et al. Investigation on soil microbial biomass and structure in *Phyllostachys edulis* plantation with increasing cultivation time ( In Chinese ). *Scientia Silvae Sinicae*, 2011, 47 ( 7 ) : 181—186
- [ 11 ] 鲁如坤. *土壤农业化学分析方法*. 北京: 中国农业科技出版社, 1999. Lu R K. *Analytical methods for soil and agro-chemistry* ( In Chinese ). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999
- [ 12 ] Simonet P, Grosjean M C, Misra A K, et al. Frankia genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57 ( 11 ) : 3278—3286
- [ 13 ] Poly F, Monrozier L J, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 2001, 152 ( 1 ) : 95—103
- [ 14 ] Coelho M R R, Marriel I E, Jenkins S N, et al. Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Applied Soil Ecology*, 2009, 42 ( 1 ) : 48—53
- [ 15 ] 张金屯. *数量生态学*. 北京: 科学出版社, 2004. Zhang J T. *Quantitative ecology* ( In Chinese ). Beijing: Science Press, 2004
- [ 16 ] 徐秋芳, 姜培坤, 董敦义, 等. 毛竹林地土壤养分动态研究. *竹子研究汇刊*, 2000, 19 ( 4 ) : 46—49. Xu Q F, Jiang P K, Dong D Y, et al. A study on dynamic changes of nutrients under *Phyllostachys pubescens* forest ( In Chinese ). *Journal of Bamboo Research*, 2000, 19 ( 4 ) : 46—49
- [ 17 ] Orr C H, James A, Leifert C, et al. Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 ( 3 ) : 911—919
- [ 18 ] Teng Q H, Sun B, Fu X R, et al. Analysis of *nifH* gene diversity in red soil amended with manure in Jiangxi, South China. *The Journal of Microbiology*, 2009, 47 ( 1 ) : 1—7
- [ 19 ] Herbert R A. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, 23 ( 5 ) : 563—590
- [ 20 ] Zou Y K, Zhang J N, Yang D L, et al. Effects of different land use patterns on *nifH* genetic diversity of

- soil nitrogen-fixing microbial communities in *Leymus chinensis* steppe. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31 (3): 150—156
- [21] 董志新, 孙波, 殷士学, 等. 气候条件和作物对黑土和潮土固氮微生物群落多样性的影响. *土壤学报*, 2012, 49 (1): 130—138. Dong Z X, Sun B, Yin S X, et al. Impacts of climate and cropping on community diversity of diazotrophs in pachic udic argiboroll and fluventic ustochrept (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2012, 49 (1): 130—138
- [22] Rösch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (8): 3818—3829
- [23] 文都日乐, 李刚, 杨殿林, 等. 呼伦贝尔草原土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性与群落结构. *生态学杂志*, 2011, 30 (4): 790—797. Wendu R L, Li G, Yang D L, et al. *NifH* gene diversity and community structure of soil nitrogen-fixing bacteria in Hulunbeier grassland, Inner Mongolia (In Chinese). *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30 (4): 790—797
- [24] Wander M M, Hedrick D S, Kaufman D, et al. The functional significance of the microbial biomass in organic and conventionally managed soils. *Plant and Soil*, 1995, 170 (1): 87—97

## EVOLVEMENT OF STRUCTURE AND ABUNDANCE OF SOIL NITROGEN-FIXING BACTERIAL COMMUNITY IN *PHYLLOSTACHYS EDULIS* PLANTATIONS WITH AGE OF TIME

He Donghua Shen Qiulan Xu Qiufang<sup>†</sup> Chen Junhui Cheng Min Mao Xinwei Li Yongchun

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems and Carbon Sequestration, School of Environmental and Resources, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China)

**Abstract** Soil nitrogen-fixing bacterial communities play a key role in nitrogen recycling in *Phyllostachys edulis* plantations forest soils. However, so far little has been reported on changes in structure and abundance of the nitrogen-fixing bacterial community in *Phyllostachys edulis* plantations with age of cultivation. In this study, soil samples were collected from the topsoil (0~20 cm) layers of four *Phyllostachys edulis* plantations different in cultivation history (5 a, 9 a, 15 a and 18 a, respectively) and a *Pinus massoniana* plantation similar in ecological background (as control, CK). Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) were employed to characterize changes in structure and abundance of the soil nitrogen-fixing bacterial communities in the soils, separately. Factors affecting structure of the nitrogen-fixing bacterial communities in soils were analysed using the redundancy analysis method. Results show that soil pH and contents of readily available potassium, available phosphorus, organic matter and ammonium nitrogen in the soil increased greatly 5 years after the transformation of *Pinus massoniana* stand into *Phyllostachys edulis* stand, but then decreased gradually and leveled off with the plantation going on. Shannon and richness indices and *nifH* gene copies of the soil nitrogen-fixing bacterial communities show similar trends. Sequencing of DGGE bands reveals that in the soils under *Phyllostachys edulis* plantations, the N<sub>2</sub>-fixing bacteria are all unculturable azotobacteria that are quite similar to *Bradyrhizobium* sp. Redundancy analysis (RDA) shows that age of cultivation clearly affected structure of the soil nitrogen-fixing bacterial communities in *Phyllostachys edulis* plantations and the community structures in the soils after 5 a and 9 a of cultivation differed sharply from that in control. However, differences between the plots of 15 a and 18 a and control were not so significant. Besides, soil readily available potassium, available phosphorus, organic matter and

pH were the main factors affecting nitrogen-fixing bacterial community in soils under *Phyllostachys edulis* plantations. Therefore, changes in soil fertility induced by long-term *Phyllostachys edulis* plantations can potentially influence diversity of the soil nitrogen-fixing bacteria and alter their community structure.

**Key words** *Phyllostachys edulis* plantations; *NifH* gene; Diversity; Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

(责任编辑: 汪枳生)

CONTENTS

**Reviews and Comments**

A review of study on microbial ecology of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation ..... Shen Lidong ( 721 )

**Soil Science and Modern Agriculture**

- Spatio-temporal variation of total N content in farmland soil of Jiangxi Province in the past 30 years ..... Zhao Xiaomin, Shao Hua, Shi Qinghua, et al. ( 730 )
- Early warning of heavy metals potential risk governance in Beijing ..... Jiang Hongqun, Wang Binwu, Liu Xiaona, et al. ( 745 )
- Effect of deep application of straw on composition of humic acid in soil aggregates ..... Zhu Shu, Dou Sen, Chen Lizhen ( 758 )
- Effect of biochar application on pakchoi (*Brassica chinensis* L.) utilizing nitrogen in acid soil ..... Yu Yingliang, Xue Lihong, Yang Linzhang, et al. ( 766 )
- Effects of water and fertilizer on fruit yield of high-yielding clonal *Camellia oleifera* Abel ..... Zhang Wenyuan, Guo Xiaomin, Tu Shuping, et al. ( 774 )

**Research Articles**

- VRML-based virtual reality modeling of three dimensional variation of soil electrical conductivity ..... Li Hongyi, Gu Chengjian, Dan Chenglong, et al. ( 781 )
- Effect of number of sampling sites on characterization of spatial variability of soil organic matter ..... Hai Nan, Zhao Yongcun, Tian Kang, et al. ( 790 )
- Research on soil water movement based on stable isotopes ..... Jin Yurong, Lu Kexin, Li Peng, et al. ( 800 )
- Basic NPK fertilizer recommendation and fertilizer formula for maize production regions in China ..... Wu Liangquan, Wu Liang, Cui Zhenling, et al. ( 816 )
- Effects of fertilization on soil organic carbon and distribution of SOC in aggregates in tidal flat polders ..... Hou Xiaojing, Yang Jingsong, Wang Xiangping, et al. ( 827 )
- Effect of long-term fertilizer application on distribution of aggregates and aggregate-associated organic carbon in paddy soil ..... Mao Xiali, Lu Kouping, He Lizhi, et al. ( 837 )
- Effects of biochar on N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> emissions from paddy field under rice-wheat rotation during rice and wheat growing seasons relative to timing of amendment ..... Li Lu, Zhou Ziqiang, Pan Xiaojian, et al. ( 847 )
- Effects of successive application of crop-straw biochar on crop yield and soil properties in cambosols ..... Liu Yuan, M. Jamal Khan, Jin Haiyang, et al. ( 857 )
- Calculation of thickness of shear plane in diffuse double layer of constant charge soil colloid in single electrolyte system ..... Ding Wuqun, Zhu Qihong, Wang Lei, et al. ( 867 )
- Effect of chemical leaching remedying chromium contaminated soil in deserted chemical plant site ..... Li Shiye, Cheng Jiemin ( 877 )
- Limiting factors for restoration of dumping sites of ionic rare earth mine tailings ..... Liu Wenshen, Liu Chang, Wang Zhiwei, et al. ( 887 )
- Residues of organochlorine pesticides in soils of Liaodong and Shandong Peninsulas ..... Zhu Yingyue, Liu Quanyong, Li He, et al. ( 900 )
- Long-term application of winter green manures changed the soil microbial biomass properties in red paddy soil ..... Gao Songjuan, Cao Weidong, Bai Jinshun, et al. ( 909 )
- Effects of intercropping with leguminous crops on tomato yield, soil nutrients and enzyme activity ..... Dai Huihui, Hu Xuefeng, Cao Mingyang, et al. ( 917 )

**Research Notes**

- Relationship of free amino acids in root exudates with wilt disease (*Fusarium oxysporum*) of faba bean ..... Dong yan, Dong Kun, Tang Li, et al. ( 924 )
- Effects of intercropping of wheat and faba bean on diversity of metabolic function of rhizosphere fungal community ..... Hu Guobin, Dong Kun, Dong Yan, et al. ( 933 )
- Evolvement of structure and abundance of soil nitrogen-fixing bacterial community in *Phyllostachys edulis* plantations with age of time ..... He Donghua, Shen Qiulan, Xu Qiufang, et al. ( 941 )
- Effect of long-term fertilization on carbon sequestration in lime concretion black soil relative to fertilization pattern ..... Li Wei, Kong Lingcong, Zhang Cunling, et al. ( 949 )
- Effects of interplanting grass on utilization, loss and accumulation of <sup>15</sup>N in apple orchard ..... Peng Ling, Wen Zhao, An Xin, et al. ( 955 )

**Cover Picture:** Full view of ionic rare earth mine desert (by Tang Yetao, Liu Wenshen)

# 《土壤学报》编辑委员会

主 编：史学正

执行编委：(按姓氏笔画为序)

丁维新	巨晓棠	王敬国	王朝辉	史 舟	宇万太	朱永官
李永涛	李芳柏	李保国	李 航	吴金水	沈其荣	张玉龙
张甘霖	张福锁	陈德明	邵明安	杨劲松	杨明义	杨林章
林先贵	依艳丽	周东美	周健民	金继运	逢焕成	胡 锋
施卫明	骆永明	赵小敏	贾仲君	徐国华	徐明岗	徐建明
崔中利	常志州	黄巧云	章明奎	蒋 新	彭新华	雷 梅
窦 森	廖宗文	蔡祖聪	蔡崇法	潘根兴	魏朝富	

编辑部主任：陈德明

责任编辑：汪枳生 卢 萍 檀满枝

## 土 壤 学 报

### Turang Xuebao

(双月刊, 1948年创刊)

第 52 卷 第 4 期 2015 年 7 月

## ACTA PEDOLOGICA SINICA

(Bimonthly, Started in 1948)

Vol. 52 No. 4 July, 2015

编 辑 《土壤学报》编辑委员会  
地址：南京市北京东路 71 号 邮政编码：210008  
电话：025 - 86881237  
E-mail: actapedo@issas.ac.cn

Edited by Editorial Board of Acta Pedologica Sinica  
Add: 71 East Beijing Road, Nanjing 210008, China  
Tel: 025 - 86881237  
E-mail: actapedo@issas.ac.cn

主 编 史 学 正  
主 管 中 国 科 学 院  
主 办 中 国 土 壤 学 会  
承 办 中国科学院南京土壤研究所

Editor-in-Chief Shi Xuezheng  
Superintended by Chinese Academy of Sciences  
Sponsored by Soil Science Society of China  
Undertaken by Institute of Soil Science,  
Chinese Academy of Sciences

出 版 科 学 出 版 社  
地址：北京东黄城根北街 16 号 邮政编码：100717

Published by Science Press  
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,  
Beijing 100717, China

印刷装订 北京中科印刷有限公司  
总发行 科 学 出 版 社  
地址：北京东黄城根北街 16 号 邮政编码：100717  
电话：010 - 64017032  
E-mail: journal@mail.sciencep.com

Printed by Beijing Zhongke Printing Limited Company  
Distributed by Science Press  
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,  
Beijing 100717, China  
Tel: 010 - 64017032  
E-mail: journal@mail.sciencep.com

国外发行 中国国际图书贸易总公司  
地址：北京 399 信箱 邮政编码：100044

Foreign China International Book Trading Corporation  
Add: P. O. Box 399, Beijing 100044, China

国内统一刊号：CN 32-1119/P

国内邮发代号：2-560

国外发行代号：BM45

定价：60.00 元

国 内 外 公 开 发 行



ISSN 0564-3929

