DOI: 10.5846/stxb201708051406

刘彩霞,周燕,徐秋芳,陈俊辉,秦华,李永春,梁雪.毛竹林集约经营对土壤固碳细菌群落结构和多样性的影响.生态学报,2018,38(21): - . Liu C X,Zhou Y,Xu Q F,Chen J H,Qin H,Li Y C,Liang X.Effects of intensive management on the community structure and diversity of CO₂-assimilating bacteria in a *Phyllostachys pubescens* stand.Acta Ecologica Sinica,2018,38(21): - .

毛竹林集约经营对土壤固碳细菌群落结构和多样性的 影响

刘彩霞^{1,2},周 燕^{1,2},徐秋芳^{1,2,*},陈俊辉^{1,2},秦 华^{1,2},李永春^{1,2},梁雪^{1,2} 1浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室,浙江农林大学,临安 311300 2浙江农林大学环境与资源学院,临安 311300

摘要:为揭示毛竹集约经营对土壤固碳细菌的影响,分别采集集约经营时间为0、10、15、20年和25年的毛竹林土壤(0—20 cm 和 20—40 cm)土壤,应用实时荧光定量 PCR、T-RFLP 以及 cbbL 基因文库方法,分析毛竹林长期集约经营过程中土壤固碳细菌 丰度和群落结构多样性的变化,通过冗余分析(RDA)探讨影响土壤固碳细菌群落的主要环境因素。结果表明,长期的集约经营显著提高了毛竹林表层和亚表层土壤的养分含量,土壤 pH 值却明显降低。集约经营毛竹林土壤固碳微生物数量并未表现 出与 SOC 的相关性,而与 N 素水平的变化显著相关。具体表现为:随着集约经营的进行表层 cbbL 基因丰度呈先上升(10年)后 下降的规律,与氮素水平呈正相关(P<0.05);亚表层土壤 cbbL 基因丰度则呈直线下降的趋势,与 C:N 呈正相关(P<0.05)。集 约经营导致表层和亚表层土壤微生物群落结构改变,表层固碳细菌多样性指数下降。由系统发育分析可知,不可培养固碳细菌 占 56%比例,土壤中共同的优势种类多为变形菌和放线菌,以兼性自养为主。RDA 分析结果表明土壤酸化和养分积累是毛竹 林土壤固碳细菌群落和多样性变化的重要原因。

关键词:毛竹林;集约经营;固碳细菌;群落结构

Effects of intensive management on the community structure and diversity of CO₂-assimilating bacteria in a *Phyllostachys pubescens* stand

LIU Caixia^{1,2}, ZHOU Yan^{1,2}, XU Qiufang^{1,2,*}, CHEN Junhui^{1,2}, QIN Hua^{1,2}, LI Yongchun^{1,2}, LIANG Xue^{1,2}

1 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems and Carbon Sequestration, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

2 School of Environmental and Resources, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

Abstract: We examined the relative effects of long-term (25 years) intensive management on abundance and diversity of soil CO_2 -assimilating bacteria in a *Phyllostachys pubescens* (moso bamboo) forest. Soil samples in moso bamboo stands receiving 0 (control; CK), 10, 15, 20, and 25 years of intensive management were collected from the topsoil (0—20 cm) and subsoil (20—40 cm) layers separately and analyzed using quantitative PCR (q-PCR), terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), and a clone library of the *cbbL* gene. Differences in the community structure of CO_2 -assimilating bacteria over time and its relationship with soil properties were detected using redundancy analysis (RDA). We found that long-term intensive management significantly increased soil nutrient content but decreased soil pH. Among the soil parameters measured, N content influenced *cbbL* abundance, but soil organic carbon (SOC) did not. During the intensive management process, the bacterial *cbbL* abundance in topsoil increased in the first 10 years and then decreased,

收稿日期:2017-08-05; 网络出版日期:2018-00-00

基金项目:浙江省自然科学基金重点项目(LZ16C160002);国家自然科学基金项目(31570602,41671252)

^{*} 通讯作者 Corresponding author.E-mail: xuqiufang@ zafu.edu.cn

and it correlated positively with nitrogen levels (P<0.05); conversely, in subsoil, *cbbL* abundance decreased linearly with time and showed a positive correlation with C : N ratio (P<0.05). Intensive management of *P. pubescens* altered the community structure of CO₂-assimilating bacteria in both topsoil and subsoil, and induced a decline in the species diversity indices of CO₂-assimilating bacteria in topsoil. The results for the *cbbL* clone library indicated that uncultured bacteria accounted for up to 56% of the species present. The dominant species in the soil were facultative autotrophic bacteria such as *Proteobacteria* and *Actinobacteria*. RDA indicated that the changes in community structure and diversity of CO₂assimilating bacteria resulted from soil acidification and nutrient accumulation.

Key Words: intensive management; Phyllostachys pubescens stand; CO2-assimilating bacteria; community structure

毛竹(*Phyllostachy pubescens*)又称楠竹,多年生禾本科刚竹属植物,主要分布在长江以南地区,是我国分 布最广、面积最大的经济竹种。据第八次全国森林资源清查报告显示,毛竹面积已达443.01万hm²,占我国竹 林总面积的73.7%^[1]。二十世纪八九十年代我国南方地区开始大规模推行以施用化肥为主要特征的集约化 经营,这一措施提高了当地农民的收入,但长期集约化经营也给生态环境带来一系列负面影响。土壤中积累 的大量养分元素通过地表径流、渗滤和淋溶的方式进入地表和地下水,造成农业面源污染^[2-4]。更重要的是 不同学者已研究发现施肥、翻耕等集约化经营措施导致了毛竹林土壤三大菌群细菌、真菌和放线菌^[5-6]以及 某些功能菌群如固氮菌^[7]和氨氧化菌^[8]群落结构的变化。

土壤微生物多样性和群落结构显著影响土壤生态系统过程和功能的发挥,特别是地球生物化学碳循环过 程^[9]。生物固碳是地球生物化学碳循环中的重要环节,自然界中固定 CO₂的生物主要有植物和自养微生物, 其中自养微生物具有极强的环境适应能力,广泛存在于草地^[10]、森林^[11]、水稻土^[12],和海洋深处^[13]不同的生 态系统中。自养微生物主要通过同化 CO₂并将其转化为土壤有机碳来调节大气中 CO₂浓度和提高土壤的碳 固定^[14],对减缓大气 CO₂浓度升高发挥着不可忽视的作用。自养微生物迄今为止发现的 5 条固碳途径中,卡 尔文循环是自养微生物同化大气 CO₂的主要调控途径^[15],1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RubisCO)是该 过程中的关键酶。自然界存在的不同类型 RubisCO,按照其结构、催化性能和对 O₂的敏感性可分为 4 种,依次 为 RubisCO I 至 RubisCO N^[16]。*cbbL* 是 RubisCO I 的编码基因,且具有高度保守性,已被用于农田^[14]、草 地^[10]、湖泊海洋^[13],等不同生态环境中固碳微生物群落多样性的研究。

不同学者分别对福建、湖南、江西以及四川等毛竹主产区的毛竹林生态系统碳贮量进行估算,证实了毛竹林生态系统极强的年固碳能力^[17-19]。同时发现,毛竹林土壤中贮存的碳量明显高于毛竹乔木层碳,周国模等^[20]利用标准样方法估算毛竹林生态系统碳贮量为106.33 t/hm²,其中0—60 cm 土壤层碳贮量为71.47 t/hm²,乔木层为30.580 t/hm²,土壤层碳贮量约为乔木层碳贮量 2.3 倍。近年来关于毛竹林地上部分固碳作用及毛竹林生态系统贮碳量已被广泛研究^[21-22],而土壤微生物在毛竹林生态系统中的固碳作用却未见报道。本研究假设,集约经营可能对土壤固碳微生物活动产生影响。本研究选取不同集约经营历史的毛竹林地土壤,揭示集约经营对毛竹林土壤固碳 cbbL 基因的丰度和群落结构多样性的影响,以期为毛竹林的固碳潜力及可持续土壤管理提供数据支撑和理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区位于浙江省丽水市遂昌县,介于118°41′—119°30′E,28°13′—18°49′N之间,坡度20—25°,向阳, 属亚热带季风气候区,多年平均气温16.8℃,无霜期251 d,降水量1510 mm。母岩为由花岗岩变质的片麻岩 石,壤土,土壤深厚、疏松,土层厚度大于1 m。1989 年之前为竹林管理粗放经营,以劈山、垦复为主,不施用任 何肥料,毛竹密度为1800 株/hm²左右。1989 年后陆续在不同地块开始实施以施肥翻耕为主的集约经营管 理,林下基本没有灌木杂草,毛竹平均密度约3250株/hm²左右。施肥方法为:大量出笋的大年,在6月份留养的新竹叶子完全展开后,在每株毛竹的上方开出环形沟,施用尿素(或碳铵)450 kg/hm²;2000—2010年期间进行配方施肥,用量为尿素450 kg/hm²,过磷酸钙380 kg/hm²,氯化钾75 kg/hm²;2010年之后施用毛竹专用肥(福建中化生产)750 kg/hm²和尿素450 kg/hm²。

1.2 样品采集与处理

于 2013 年 9 月,选择由同一农户经营、并位于同一山上,施肥管理措施一致,不同时间开始集约经营(主要是施肥和翻耕)以及位于同一山上相邻未施肥的粗放经营毛竹林地,经营时间分别为:粗放经营(未施肥对照)、2003 年、1998 年、1993 年和 1988 年,相当于集约时间分别为 0a(记为 CK)、10a、15a、20a、25a,4 个时间梯度(处理)。每个年份毛竹林分别选取 3 个 20 m×20 m 样地(即为 3 个重复),每个样地采用 5 点取样法采集表层(0—20 cm)和亚表层(20—40 cm)土壤充分混匀过筛(2 mm)装入采样袋。样品分为 2 份,1 份放到-70℃冰箱,经冷冻干燥后,供分子生物学研究;另 1 份于室内自然风干后,研磨过筛用于基本理化性质分析。

1.3 土壤理化性质分析

土壤化学性质分析:土壤化学性质分析参照文献^[23]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(SOC)用重铬酸钾容量法;全氮(TN)采用半微 量凯氏定氮法;碱解氮(AN)采用碱解扩散法;土壤硝态氮(NO₃⁻-N)和铵态氮(NH₄⁺-N)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(AP)采用盐酸-氟化铵溶液浸提—钼锑抗比色法测定;速 效钾(AK)采用醋酸铵提取—火焰光度计测定。

1.4 土壤固碳微生物分析

1.4.1 土壤固碳功能菌 cbbL 基因荧光定量 PCR

采用 PowerSoil[™] Total DNA Isolation Kit 试剂盒提取土壤总 DNA,称取 0.5 g 冻干土样品,按照说明书进行 DNA 提取。经 1%琼脂糖凝胶电泳对所提取 DNA 的效果进行鉴定,并用微量分光光度计测定其浓度和纯度。 提取后的 DNA 分装并保存于-40℃。

采用实时荧光定量 PCR(Real-time Quantutative PCR, qPCR)测定固碳功能菌 *cbbL* 基因拷贝数,上游引物:K2f^[11] 5'-ACCA [C/T] CAAGCC [G/C] AAGCT [C/G] GG-3',下游引物 V2r : 5'-GCCTTC [C/G] AGCTTGCC [C/G] ACC [G/A] C-3',得到 492 bp—495 bp 的扩增产物^[24]。使用 CFX 96 [™] Real-Time System (Bio-Rad, USA) 仪器对 *cbbL* 基因进行荧光定量 PCR 扩增,每个样品重复 3 次。体系组成如下: 2×SYBR Premix Ex Taq[™]10 μ L,50 μ mol/L 上游和下游引物各 0.2 μ L,模板 DNA 1 μ L,ddH2O 补水至 20 μ L。反应程 序参照文献^[24]:95℃预变性 3 min,40 个循环包括 95℃ 10s,62℃ 40 s,72℃ 30 s。荧光定量 PCR 扩增产物经 琼脂糖凝胶电泳回收后,与 pEASY-T3 载体连接并转接入大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,在含 Ampicillin 平板上 进行蓝白斑筛选阳性克隆,挑选部分阳性克隆子送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序获得 的已知阳性克隆子扩大培养提取质粒 DNA,用微量分光光度计检测浓度和纯度(OD₂₆₀/OD₂₈₀)。重组质粒梯 度稀释后 8 倍作为 *cbbL* 基因的荧光定量 PCR 标准样品,标准样品的反应体系和反应程序同上^[24]。溶解曲线 为单一峰型,说明条件符合要求,引物特异性良好。表层和亚表层土壤扩增效率为 96.6%和 93.9%,标线 R² 均大于 0.995。

1.4.2 固碳功能菌 cbbL 基因末端限制性片段长度多态分析(T-RFLP)

采用 T-RFLP 技术分析固碳功能菌群落,引物 K2f 和 V2r^[10]。上游引物 5′端用 FAM 荧光标记,反应体系 包括 Premix 10 µL、10 µmol /L 的上游和下游引物各 0.2 µL、Bovine Serum Albumin(BSA,20 mg/mL)0.2 µL、 DNA 模板 0.3 µL、ddH2O 补水至 50 µL,反应程序^[26]:95℃ 预变性 3min,95℃变性 1 min,62℃退火 1 min, 72℃延伸 90 s,35 个循环,72℃ 10 min。PCR 产物经纯化后,用限制性内切酶 *MspI*在 37℃下消化 4 h,酶切产 物送往生工生物工程(上海)股份有限公司利用毛细管电泳检测自动测序分析。将图谱中±1 bp T-RFs 视为 一个 OTU,当 T-RFs 的相对丰度>1%时可纳入后续分析;相对丰度>10%被视为优势种群^[24]。

1.4.3 固碳功能菌 cbbL 基因克隆文库

构建固碳功能细菌 cbbL 基因克隆文库来确定固碳自养微生物的种类。扩增 PCR,引物及反应程序同荧 光定量 PCR。PCR 产物纯化后连接到 pEASY-T3 载体连接并转接入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,在氨苄青霉 素平板进行蓝白斑挑选,验阳挑选 200 个阳性克隆子送至生工生物工程有限公司(上海)测序。利用 DOTUR 软件将相似性大于 97%的序列视为同一操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU)^[25]。分别以 NCBI 数据库中 cbbL 基因 BLAST 结果相似性大于 90% 的序列为参比序列^[25],利用 Clustal X 进行多重比对,采用 MEGA 5.0 中的 Neighbor-joining 法构建系统发育树。所获得的 cbbL 基因序列提交至 NCBI,序列登录号为 MF430937-MF431023

1.5 数据处理

采用 Microsoft Excel 2007 软件对数据进行处理, OriginPro 8 软件作图, SPSS 18.0 软件对数据进行统计分 析。根据 T-RFLP 图谱中 OTU 的数目及其丰度通过 BIO-DAP 程序(http://nhsbig.inhs.uiuc.edu/wes/ population.html)计算样品的多样性指数。采用 Canoco 4.5 软件(Mocrocomputer Power, Ithaca, USA)对 T-RFLP 结果进行冗余分析(RDA)。

2 结果分析

2.1 毛竹林集约经营过程中土壤理化性质变化

不同集约经营历史毛竹林土壤样品的理化性质结果如下表1所示。随着集约经营年限的延长,表层和亚 表层土壤 pH 呈下降趋势,有效磷(AP)、速效钾(AK)和硝态氮(NOζ-N)则整体呈增加趋势。有机碳(SOC) 在经营 10a 后显著高于(P<0.05)CK,之后随经营年限增加表层和亚表层有机碳显著(P<0.05)下降,亚表层 在 25a 达到最大值 21.67 g/kg。表层和亚表层经营年限 TN 含量整体高于 CK(表层 15 年除外),表层 TN 在 10a 达到最大值 3.10 g/kg, 亚表层则在 25a 达到最大值 2.91 g/kg。而 C:N 集约经营后表层和亚表层土壤 C: N 均有增加的现象,但与对照相比没有显著差异,表层土和亚表层土壤C:N 分别 20a 和 15a 时出现显著(P< 0.05)下降的转折点。NH⁺₄-N 在经营过程中无显著变化。

Table 1 Soil characteristics of long-term intensive managed Phyllostachys pubescens stand										
土层 Layer	处理 Treatment	рН	有机碳 Soil organic carbon/ (g/kg)	全氮 Total N/ (g/kg)	C : N	碱解氮 Alkalytic N /(mg/kg)	有效磷 Available P /(mg/kg)	速效钾 Available K /(mg/kg)	硝态氮 NO3-N /(mg/kg)	铵态氮 NH ₄ -N /(mg/kg)
0—20 cm	СК	4.48±0.01a	$23.34{\pm}1.81\mathrm{b}$	$2.36{\pm}0.20{\rm b}$	$9.91{\pm}0.32{\rm bc}$	72.72±1.21d	$1.14 \pm 0.07 \mathrm{b}$	$36.67{\pm}4.04{\rm c}$	19.31±1.05d	17.7±2.17ab
	10a	$4.15{\pm}0.12\mathrm{b}$	32.50±0.99a	3.10±0.08a	10.48±0.23ab	121.03±9.78a	1.74±0.64ab	$31.33{\pm}0.58{\rm c}$	$13.03 \pm 1.40e$	$16.35 \pm 3.02 \mathrm{b}$
	15a	$4.10{\pm}0.06{\rm b}$	$25.05{\pm}0.73~\mathrm{b}$	$2.21{\pm}0.42\mathrm{b}$	11.59±1.96a	$81.47{\pm}3.70{\rm c}$	2.01±0.17ab	$34.33{\pm}0.58{\rm c}$	$40.58{\pm}2.85{\rm c}$	18.44±1.53ab
	20a	$4.16{\pm}0.14{\rm b}$	$22.33 \pm 4.31 \mathrm{b}$	2.77±0.47ab	$8.05{\pm}0.18{\rm c}$	$70.76{\pm}0.75{\rm d}$	$2.24 \pm 1.22 ab$	$48.50{\pm}0.71\mathrm{b}$	$52.02{\pm}6.24\mathrm{b}$	18.43±0.98ab
	25a	$3.99{\pm}0.08{\rm b}$	$25.35{\pm}2.21\mathrm{b}$	2.83 ± 0.42 ab	$9.12{\pm}1.68{\rm bc}$	$93.40{\pm}1.00{\rm b}$	2.89±0.01a	$68.50 \pm 7.78a$	78.22±1.89a	21.90±3.16a
20—40 cm	СК	4.46±0.04a	$15.39{\pm}1.56\mathrm{b}$	$1.11{\pm}0.16{\rm c}$	13.92±1.07a	$44.29{\pm}0.28\mathrm{b}$	$0.44{\pm}0.04{\rm b}$	$28.00{\pm}5.29\mathrm{b}$	$18.13{\pm}0.28{\rm b}$	23.05±4.92a
	10a	4.47±0.14a	21.56±0.73a	1.42±0.20ab	15.33±1.54a	$52.42{\pm}7.42\mathrm{b}$	0.79±0.15ab	$26.33{\pm}0.58\mathrm{b}$	$11.35{\pm}1.38{\rm c}$	17.99±1.32a
	15a	4.43±0.10a	14.91±1.11b	$1.44\pm0.10\mathrm{b}$	$10.37{\pm}0.64{\rm b}$	$48.37{\pm}5.41\mathrm{b}$	$0.87{\pm}0.30{\rm ab}$	37.00±2.65a	$24.12{\pm}4.37\mathrm{b}$	18.54±2.32a
	20a	4.37±0.14a	$12.37{\pm}0.88{\rm c}$	1.42±0.17ab	$8.82{\pm}1.68{\rm bc}$	$49.28{\pm}6.36\mathrm{b}$	1.05±0.78ab	33.33±6.66ab	$37.23 \pm 4.49 \mathrm{b}$	17.40±1.81a
	25a	$4.04{\pm}0.02{\rm b}$	21.67±0.37a	2.91±0.19a	$7.47{\pm}0.42{\rm c}$	77.77±9.05a	1.68±0.84a	40.50±0.71a	59.09±4.96a	22.67±4.35a

表1 不同集约经营年限毛竹林土壤理化性质

1 01 11

CK; 空白对照, Control check; 10a; 集约经营 10年; 15a; 集约经营 10年; 20a; 集约经营 20年; 25a; 集约经营 25年; 平均值 ±标准偏差(n=3); 同列数值后不同 小写字母代表同一土层不同经营年限的显著性差异(P<0.05);除全氮和C:N比数据外,其他指标与何冬华^[7]相同

2.2 毛竹林集约经营过程中土壤 cbbL 基因数量变化及其与土壤性质的关系

实时荧光定量 PCR 对不同集约经营历史毛竹林土壤 cbbL 基因的拷贝数分析结果表明(图1),土壤 cbbL

基因的拷贝数范围是 7.95×10⁸—1.61×10⁹拷贝数/g 土。 表层土壤 cbbL 基因拷贝数在集约经营开始的 10a 达到 最大值1.23×10°拷贝数/g土,而后下降。随着经营时 间的延长在 20a 显著提高, 25a 又下降, 整体呈先上升 后下降的规律;亚表层土壤 cbbL 基因拷贝数则呈整体 下降的趋势。利用 SPSS 分析 cbbL 基因数量与土壤理 化性质的相关性发现,不同土层土壤的结果不同。表层 土壤固碳细菌 cbbL 基因数量与 AN 和 TN 之间则呈现 显著的正相关(P=0.038;P=0.006),与C:N呈显著的 负相关(P=0.035);亚表层土壤 cbbL 基因数量与 AN (P=0.023),TN(P=0.004)和NO₃-N(P=0.000)的含量 呈显著负相关性,与C:N呈显著的正相关(P=0.000)。 其中土壤 AN、TN 以及 C:N 与固碳细菌 cbbL 基因数量 在两个土层的结果相反。两个土层合在一起的相关性 结果是,土壤固碳细菌 cbbL 基因数量与 pH 和 C:N 之 间则显著正相关(P=0.026;P=0.023),与NO₃-N显著 负相关(P=0.002)。以上结果说明,不同土壤性质对 cbbL 基因数量的影响因土层而异。



图 1 不同集约经营年限毛竹林土壤固碳细菌 *cbbL* 基因丰度 Fig.1 Abundance of *cbbL* gene under long-term intensive managed *Phyllostachys pubescens* stand

大写字母代表 0—20cm 土层不同经营年限的显著性差异(P<0. 05);4 小写字母代表 20—40cm 土层不同经营年限的显著性差异 (P<0.05)

2.3 毛竹林集约经营过程中土壤固碳细菌结构及物种变化

扩增的产物经 *MspI* 酶切处理后,得到 40—488 bp 之间的 T-RFs19 条。如图所示(图 2)其中 177 bp 是所 有表层和亚表层土壤的优势片段(20.70%—45.52%)。第二优势片段 40 bp(7.96%—17.79%),随着集约经营 时间延长其相对丰度提高,分别在表层和亚表层 15a 达到最大值(17.79%和 16.57%),在随后的经营年限中





Fig.2 Relative abundance of cbbL T-RFs under long-term intensive managed Phyllostachys pubescens forests

T-RFs: 限制性多态片段, Terminal restriction fragments

表的微生物产生影响。

又逐渐下降。213 bp 与 40 bp 具有相同的变化规律,但并未成为优势片段。360 bp 与 40 bp 及 213 bp 规律相 反,表层和亚表层 15a 丰度最低(3.06%和 11.77%),它是亚表层的第三优势片段。以上描述的片段出现在所 有土壤处理(年限)中,集约经营措施只改变其丰度;而有些片段只出现在某 1 个或几个集约经营年限土壤 中,如表层中的 49 bp、127 bp、129 bp 和亚表层中的 362 bp 在 CK 中出现,随着集约经营的进行消失,在随后 的经营年限土壤中又出现;相反表层中的 219 bp、364 bp 和 488 bp 与亚表层 42 bp、219 bp 并未在 CK 中出现, 在毛竹林开始集约经营后逐渐出现;488 bp 是表层特有片段,但并非优势片段。说明施肥翻耕对这些片段代

本研究挑选 200 个阳性克隆子测序,基于 97%的相似性被分成 64 个 OTU。系统进化分析结果显示(图 3),序列共形成 3 个未知 Cluster 簇(56%),余下的序列与变形菌门(*Proteobacteria*)的 α-*Proteobacteria*(11%) 和 γ-*Proteobacteria*(6%)以及 Actinobacteria(28%)相似度较高。T-RFLP 图谱结合系统发育分析发现,第一优势 T-RF 片段 177 bp 与慢生根瘤菌 Bradyrhizobiu mottawaense (LT629693.1)、慢生根瘤菌 Bradyrhizobium icense (CP016428.1)、沼泽红假单胞菌 Rhodopseudomonas palustris (CP000283.1)、Starkeya novella (CP002026.1)、高



图 3 基于部分 cbbL 序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on partial cbbL sequences

温单孢菌 Thermomonospora curvata (CP001738.1)和 Dokdonella koreensis(CP015249.1)亲缘关系较近,分布在 3 个未知 Cluster 簇、 α -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria 簇和 Actinobacteria 簇上,与来自草地^[10]、森林^[25]和水稻 土^[12]的基因序列相似度高。362 bp 和 36 bp 与 Thermomonospoa curvata (CP001738.1)亲缘关系较近,分布在 Actinobacteria 簇上,与来自旱地^[26]和草地^[10]的基因序列相似度高。175 bp 分布在 Cluster Ⅲ簇上,同样与来 自旱地^[26]和草地^[10]的基因序列相似度高。第二优势片段 40 bp 本研究中虽未克隆到该片段,但已有学者^[27] 利用与本研究相同的 MspI 酶研究固碳细菌时发现,40±1 bp 与 Bradyrhizobiu mottaweanse(LT629693.1)的亲缘 相似度达 76%。

2.4 毛竹集约经营过程中 cbbL 基因多样性变化

根据 T-RFLP 图谱中 T-RFs 分别计算了表层和亚表层不同经营年限土壤样品的多样性指数 Shannon 指数 (H)、均匀度指数(E)和 Simpson 指数(D),分别从微生物群落物种丰富度、物种均一性和常见物种 3 个方面 反映了微生物群落功能多样性(表 2)。结果表明,表层土壤 Shannon 指数和均匀度指数随着集约经营年限的 延长显著降低,在 25a 达到最低,Simpson 指数随着集约经营年限的延长显著增加,在 25a 达到最大值。集约 经营并未对亚表层土壤固碳微生物 Shannon 指数、Simpson 指数和均匀度指数产生显著影响。说明集约经营 显著降低了表层固碳细菌的物种丰富度和均一性,而增加了常见物种数量,但并未对亚表层固碳细菌的多样 性产生影响。利用 SPSS 分析各多样性指数土壤理化性质的相关性发现(表 3),表层土壤 Shannon 指数与 pH 之间则呈现显著的正相关(P=0.033),与 AP、AK 和 NO₃⁻-N(P=0.003;P=0.000;P=0.001)呈显著的负相关; 均匀度指数与 AN(P=0.013)呈现显著的正相关,与 AP(P=0.001)、AK(P=0.000)和 NO₃⁻-N(P=0.001)呈显著的负相关;Simpson 指数与 pH(P=0.008)呈显著的负相关,与 AP(P=0.031)、AK(P=0.000)和 NO₃⁻-N(P=0.001)呈显著的页相关。亚表层均匀度指数与 TN(P=0.029)和 C:N(P=0.034 呈显著的负相关,与 AP(P=0.046)呈显著的正相关。

Table 2 Effects of cultivation years on the biodiversity indices of CO ₂ -assimilating bacteria in soils									
处理 Treatment	Shannon 指数 Sh	annon $index(H)$	均匀度指数 Eve	ennessindex(E)	Simpson 指数 Simpson index(D)				
	0—20 cm	20—40 cm	0—20 cm	20—40 cm	0—20 cm	20—40 cm			
СК	2.09±0.07a	2.06±0.05a	0.79±0.79a	0.83±0.02a	$0.14 \pm 0.01 \mathrm{c}$	0.17±0.02a			
10a	$1.90 \pm 0.10 \mathrm{ab}$	1.90±0.16a	$0.76 \pm 0.04 \mathrm{ab}$	$0.75 \pm 0.06a$	$0.22{\pm}0.03{\rm bc}$	0.22±0.04a			
15a	$1.98 \pm 0.19 \mathrm{ab}$	1.91±0.14a	$0.80 \pm 0.02a$	$0.80 \pm 0.02a$	$0.18{\pm}0.03{\rm c}$	$0.19 \pm 0.02a$			
20a	$1.76 \pm 0.05 \mathrm{bc}$	1.84±0.21a	$0.72{\pm}0.04{\rm b}$	0.79±0.05a	$0.26{\pm}0.03{\rm b}$	$0.20 \pm 0.05 a$			
25a	1.55±0.21c	1.78±0.30a	$0.63 \pm 0.06c$	$0.76 \pm 0.08a$	0.34±0.06a	$0.20 \pm 0.05 a$			

表 2 不同经营历史毛竹林土壤固碳微生物多样性指数

同列数值后不同小写字母代表不同经营年限的显著性差异(P<0.05)

表 3 土壤理化因子与 cbbL 基因多样性指数相关性分析

|--|

						2	0		
土层	0—20 cm			20—40 cm			0—40 cm		
Layer	Н	Ε	D	Н	Ε	D	Н	Ε	D
pH	0.551 *	0.351	-0.659 *	0.158	0.221	-0.493	0.404 *	0.416*	-0.621 **
有机碳 Organic carbon	0.047	0.159	0.052	-0.152	-0.399	0.405	-0.146	-0.352	0.319
全氮 Total N	-0.123	-0.023	0.203	-0.234	-0.254 *	0.563	-0.229	-0.362	0.407 *
C:N	0.447	-0.398	0.391	-0.311	-0.217 *	0.55	-0.352	-0.466 **	0.487 **
碱解氮 Alkalytic N	0.447	0.622 **	-0.382	0.295	-0.057	-0.308	0.346	0.263	-0.337
有效磷 Available P	-0.707 **	-0.781 **	0.558 **	-0.017	0.08 *	0.521	-0.450 **	-0.573 **	0.583 **
速效钾 Available K	-0.83 **	-0.833 **	0.854 **	-0.337	-0.181	0.203	-0.673 **	-0.698 **	0.739 **
硝态氮 NO3-N	-0.757 **	-0.753 **	0.753 **	-0.243	-0.044	0.444	-0.585 **	-0.531 **	0.681 **
铵态氮 NH ₄ -N	-0.493	-0.548	0.459	0.416	0.355	-0.054	0.014	0.028	0.14

*代表相关性达到显著水平 P<0.05;**代表相关性达到极显著水平 P<0.01

2.5 环境因子对土壤固碳微生物群落结构的影响

以 T-RFLP 片段信息和土壤化学性质为两组变量进行冗余分析(RDA)(图4)。从二维排序轴上可知,表 层土壤中 CK 与集约经营 10a、15a、20a、25a 样地在第一排序轴上显著分开,CK 主要分布在第一排序轴正轴 上,10a、15a、20a、25a 处理主要分布在第一排序轴负轴上。亚表层土壤中 CK 与 10a、15a、20a 样地固碳细菌 群落结构较为接近,在第一排序轴上与 25a 分开,CK 与 10a、15a、20a 主要分布在第一排序轴负轴上,25a 主要 分布在第一排序轴正轴上。以上结果说明集约经营措施对表层和亚表层土壤固碳细菌的群落结构均有显著 影响。

根据 Canoco 的 forward 分析,从表层和亚表层的 9 个环境因子中分别筛选出有显著解释性(P<0.05)的环 境变量来解释环境因子对土壤固碳细菌群落结构的影响,表层土壤 pH(P=0.002)、AK(P=0.016)、NO₃⁻-N (P=0.008)和 AP(P=0.002)等4 个变量均与表层土壤固碳细菌群落显著相关,而亚表层土壤显著相关(P<0.05)的变量分别是 pH(P=0.028)、AN(P=0.034)、NO₃⁻-N(P=0.038)、AP(P=0.016)和 TN(P=0.048),其中, pH、NO₃⁻-N 和 AP 等 3 个变量则与表层和亚表层土壤固碳细菌群落结构变化均显著相关(P<0.05),说明群落 分布主要受其影响。同时不同经营年限土壤养分发生变化,不同经营年限土壤固碳微生物群落结构受不同土 壤理化因子的影响。其中表层 CK 主要受 pH 的影响,25a 主要受 AK、NO₃⁻-N 和 AP 的影响;亚表层 CK、15a 和 20a 主要受 pH 的影响,25a 主要受 AN、TN、NO₃⁻-N 和 AP 的影响。RDA 结果显示,表层土壤第一和第二排序 轴分别解释了样本中的 42.2%和 20.8%的变异,两者合并解释了样本 63.1%的总变异;亚表层土壤第一和第 二排序轴则分别解释了样本中 22.9%和 19.4%的变异,两者合并解释了样本 42.3%的总变异,说明土壤性质 的变化是固碳微生物群落结构的影响的主要原因。







3 讨论

以施肥和翻耕为主的集约经营显著影响了毛竹林土壤三大菌群细菌、真菌和放线菌^[5-6]以及某些功能菌 群如固氮菌^[7]和氨氧化菌^[8]群落结构的变化。本研究假设,集约经营可能同样对固碳微生物产生影响。T-RFLP 图谱分析表明,毛竹集约经营后某些片段从无到有(表层中的 219 bp 和 364 bp 与亚表层 42 bp、219 bp),某些片段从有到无、再出现(表层中的 49 bp、127 bp、129 bp 和亚表层中的 175 bp、362 bp),说明毛竹林 进行集约经营显著影响固碳细菌群落结构。第一和第二优势片段 177 bp 和 40 bp 的相对丰度增加,毛竹林集 约经营后表层土壤 177 bp 在亚表层土壤变化不明显、片段 40 bp 表现出增加趋势。从系统发育可知,优势片 段多为兼性自养细菌,与 Tolli 等^[11]报道的松林和旱地的兼性自养细菌大于专性自养细菌的结论相类似。袁 红朝等^[28]在研究施肥对固碳功能菌群落结构时发现,长期施肥使硫杆菌,亚硝化螺菌(严格自养菌)等种群 优势明显降低,而产碱杆菌(兼性自养菌)优势度上升。固碳自养细菌按能量来源可分为光能型和化能型, Wu 等^[29]的研究显示光照主要影响表层1 cm 左右的碳同化自养微生物。而兼性自养细菌则能够利用除有机 化合物外更广的能量,如铵盐、亚硝酸、硫、硫化氢等无化合物,在光源不足的土层中保证其正常的生长代谢, 因此其成为优势种群。

已有研究表明,SOC 是影响固碳微生物的主要因素,如 Yuan 等^[30]对水稻田不同施肥条件(CK、NPK 和 NPKM)下固碳细菌研究结果为 SOC 与固碳细菌数量有显著正相关性,刘琼等^[31]在稻田固碳功能微生物群落 结构和数量研究中也得到相同结果。土壤固碳细菌虽然是自养微生物,固定 CO,合成自己的体细胞,但需要 分解有机质作为能源。SOC 既为微生物生长繁殖提供所需能量,同时其分解过程中释放的大量 CO,又成为固 碳微生物的碳源,有利于自养固碳微生物生长^[32],提高了自养细菌 cbbL 基因的数量。不同集约经营历史毛 竹林土壤 cbbL 基因的数量表明,随着集约经营时间增加,表层土壤 cbbL 基因丰度表现为先上升后下降的规 律。这与表层 SOC 的变化规律相似,经营初期 10a 的毛竹林 SOC 达到最大值,而后下降,然而两者的相关性 没有达到显著水平。cbbL 基因数量与理化因子进行的相关性分析表明,表层土壤固碳细菌 cbbL 基因数量与 AN 和 TN 之间则呈现显著的正相关,而与 C:N 呈显著的负相关,这些关系说明土壤氮素对土壤固碳细菌有 促进作用。微生物合成体细胞需要一定数量的氮与碳组成,固碳细菌固定 CO,作为体细胞碳源,而氮源主要 有由土壤供给,这可能是土壤 cbbL 基因与 SOC 没有达到显著正相关的原因。亚表层土壤 cbbL 基因数量随着 集约经营时间增加急剧下降,与 AN、TN 和 NO₃-N 含量呈显著负相关,而与 C:N 呈显著正相关。亚表层土壤 有机碳和全氮均明显低于表层,相比表层土壤与地表大气交换频繁、CO,更新补充快,而亚表层中 CO,主要来 源于有机质分解,固碳微生物活动所需的碳源和能源均通过有机质分解,因此土壤碳源的丰缺成为固碳微生 物限制因子。由于细菌活动需要合适的 C:N 比(25:1),毛竹集约经营后土壤氮素积累明显,C:N 逐渐下降是 导致 cbbL 基因丰度下降的原因。土壤 AN、TN 以及 C:N 与固碳细菌 cbbL 基因数量相关关系在两个土层的结 果相反,可能是表层土壤与亚表层土壤固碳细菌获得碳源途径的不同所致。微生物与环境中元素的供给及其 计量比之间是相互联系、相互作用的^[33]。生态化学计量学(Ecological Stoichiometry)原理表明,有机体中碳氮 维持一定的比例关系[34]。微生物为保持自身有机体的碳氮平衡,纯自养或异养、兼性自养等不同类型微生物 对外界的 C、N 进行反馈调节存在差异。本研究发现固碳细菌细菌多为兼性自养,因此对 C、N 进行反馈调可 能因环境而异、比较复杂,没有很强的规律。

微生物多样性指数中的 Shannon 指数、Simpson 指数和均匀度指数分别从微生物群落物种丰富度、常见物种和物种均一性 3 个方面反映了微生物群落功能多样性,而 pH 是影响其的重要环境因子。Feng 等^[35] 发现在大的空间尺度下土壤 pH 是影响微生物多样性的关键因子。在一定范围内 pH 与细菌多样性呈正比,因为外界环境中 H*浓度增加将影响微生物菌体细胞膜的透性及膜结构的稳定性,破坏有机体对物质的吸收,影响微生物的正常生长;同时提高某些有害重金属元素如铝、锰等的活性,对土壤生物造成危害^[32]。本研究中集约经营导致土壤固碳微生物 Shannon 指数和均匀度指数显著降低,表层土壤 Shannon 指数与 pH 之间则呈现显著的正相关,这可能与长期大量使用化肥显著降低了土壤 pH(表层和亚表层土壤 pH 在种植经营 25a 后已降低至 4.0 左右)有关。土壤 pH 对固碳微生物的影响也有报道,Yuan 等^[30]在水稻田固碳微生物的群落结构研究时发现 pH 是固碳细菌的主要限制因子,与本研究结果相同。亚表层土壤 pH 在集约经营的 25a 后才开始下降,因此 pH 并未对 10a、15a 和 20a 固碳细菌多样性产生显著影响,Shannon 指数与 pH 之间没有显著正相关。RDA 结果证明,表层和亚表层土壤的固碳微生物群落结构变化均显著相关(P<0.05);表层与亚表层土壤第一与第二排序轴分别解释了样本 63.1%和 42.3%的总变异,说明除了土壤性质外还有其他因素引起了固碳微生物群落结构的变化,如植被的变化同样会引起固碳微生物群落的变化^[24,27]。因此,无机肥料连续施用引起的土壤酸化和养分积累是毛竹林土壤微生物群落和多样性变化的重要原因。

4 结论

本研究表明,长期集约经营显著提高了毛竹林表层和亚表层土壤的养分含量、降低土壤 pH 值。集约经营毛竹林土壤固碳微生物数量并未表现出与 SOC 的相关性,而与 N 素水平的变化显著相关。具体表现为:随着集约经营的进行表层土壤 cbbL 基因丰度呈先上升后下降的规律,与氮素水平呈正相关;亚表层土壤 cbbL 基因丰度则呈直线下降趋势,与 C:N 比呈正相关。集约经营导致表层和亚表层土壤微生物群落结构改变、表层固碳细菌多样性指数下降。系统发育分析表明,不可培养固碳细菌占 56%比例,土壤中具有共同的优势种类多为变形菌和放线菌,以兼性自养为主。RDA 分析结果表明土壤酸化和养分积累是毛竹林土壤固碳细菌群落和多样性变化的重要原因。

参考文献(References):

- [1] 国家林业局. 中国森林资源报告. 北京: 中国林业出版社, 2014.
- [2] 韩晓飞,谢德体,高明,王子芳,陈晨.减磷配施有机肥对水旱轮作紫色水稻土磷素淋失的消减效应. 生态学报, 2017, 37(10): 3525-3532.
- [3] Hendricks N P, Sinnathamby S, Douglas-Mankin K, Smith A, Sumner D A, Earnhart D H. The environmental effects of crop price increases: nitrogen losses in the U.S. Corn Belt. Journal of Environmental Economics and Management, 2014, 68(3): 507-526.
- [4] McDowell R W. Minimising phosphorus losses from the soil matrix. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(6): 860-865.
- [5] 孙棣棣. 应用磷脂脂肪酸方法研究毛竹林土壤微生物群落结构演变规律[D]. 杭州:浙江农林大学, 2010.
- [6] Qin H, Chen J H, Wu Q F, Niu L M, Li Y C, Liang C F, Shen Y, Xu Q F. Intensive management decreases soil aggregation and changes the abundance and community compositions of arbuscular mycorrhizal fungi in Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) forests. Forest Ecology and Management, 2017, 400: 246-255.
- [7] 何冬华,陈俊辉,徐秋芳,沈秋兰,李永春,毛新伟,程敏.集约经营对毛竹林土壤固氮细菌群落结构和丰度的影响.应用生态学报, 2015,26(10):2961-2968.
- [8] 田甜. 毛竹林土壤氨氧化微生物功能基因多样性[D]. 杭州:浙江农林大学, 2011.
- [9] 沈菊培, 贺纪正. 微生物介导的碳氮循环过程对全球气候变化的响应. 生态学报, 2011, 31(11): 2957-2967.
- [10] Guo G X, Kong W D, Liu J B, Zhao J X, Du H D, Zhang X Z, Xia P H. Diversity and distribution of autotrophic microbial community along environmental gradients in grassland soils on the Tibetan Plateau. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(20): 8765-8776.
- [11] Tolli J, King G M. Diversity and structure of bacterial chemolithotrophic communities in pine forest and agroecosystem soils. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8411-8418.
- [12] Xiao K Q, Bao P, Bao Q L, Jia Y, Huang F Y, Su J Q, Zhu Y G. Quantitative analyses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) large-subunit genes (*cbbL*) in typical paddy soils. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 87(1): 89-101.
- [13] Elsaied H, Naganuma T. Phylogenetic diversity of ribulose- 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes from deep-sea microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1751-1765.
- [14] Ge T D, Wu X H, Chen X J, Yuan H Z, Zou Z Y, Li B Z, Zhou P, Liu S L, Tong C L, Brookes P, Wu J S. Microbial phototrophic fixation of atmospheric CO₂ in China subtropical upland and paddy soils. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2013, 113(4): 70-78.
- [15] Berg I A. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77 (6): 1925-1936.
- [16] Bassham J A, Benson A A, Calvin M. The path of carbon in photosynthesis. The Journal of Biological Chemistry, 1950, 185(2): 781-787.
- [17] 肖复明,范少辉,汪思龙,熊彩云,张池,刘素萍,张剑. 毛竹(Phyllostachy pubescens)、杉木(Cunninghamia lanceolata)人工林生态系统碳 贮量及其分配特征. 生态学报, 2007, 27(7): 2794-2801.
- [18] 谢海慧,苏阿兰,吴承祯,林勇明,洪伟,李键,陈灿,洪滔.福建省典型生长区毛竹林生态系统碳密度研究.西南林业大学学报,2014, 34(2):28-34.
- [19] 徐小军,周国模,杜华强,周宇峰,胡军国,陆国富. 样本分层对毛竹林地上部分碳储量估算精度的影响. 林业科学, 2013, 49(6): 18-24.
- [20] 周国模,姜培坤.毛竹林的碳密度和碳贮量及其空间分布.林业科学,2004,40(6):20-24.
- [21] 杜满义,刘广路,范少辉,封焕英,唐晓鹿,毛超.施肥对闽西毛竹生物量及碳储量分布格局的影响.热带作物学报,2015,36(5): 872-877.

38 卷

- [22] 刘应芳,黄从德,陈其兵.蜀南竹海风景区毛竹林生态系统碳储量及其空间分配特征.四川农业大学学报,2010,28(2):136-140.
- [23] 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.
- [24] Yuan H Z, Ge T D, Zou S Y, Wu X H, Liu S L, Zhou P, Chen X J, Brookes P, Wu J S. Effect of land use on the abundance and diversity of autotrophic bacteria as measured by ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) large subunit gene abundance in soils. Biology and Fertility of Soils, 2013, 49(5): 609-616.
- [25] Lynn T M, Ge T D, Yuan H Z, Wei X M, Wu X H, Xiao K Q, Kumaresan D, Yu S S, Wu J S, Whiteley A S. Soil carbon-fixation rates and associated bacterial diversity and abundance in three natural ecosystems. Microbial Ecology, 2017, 73(3): 645-657.
- [26] Yuan H Z, Ge T D, Chen C Y, O'Donnell A G, Wu J S. Significant role for microbial autotrophy in the sequestration of soil carbon. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(7): 2328-2336.
- [27] 梁雪. 毛竹入侵阔叶林对土壤固碳功能菌群落特征的影响及其机制[D]. 杭州:浙江农林大学, 2017.
- [28] 袁红朝,秦红灵,刘守龙,童成立,葛体达,魏文学,吴金水.长期施肥对稻田土壤固碳功能菌群落结构和数量的影响.生态学报,2012, 32(1):183-189.
- [29] Wu X H, Ge T D, Yuan H Z, Li B Z, Zhu H H, Zhou P, Sui F G, O'Donnell A G, Wu J S. Changes in bacterial CO₂ fixation with depth in agricultural soils. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(5): 2309-2319.
- [30] Yuan H Z, Ge T D, Wu X H, Liu S L, Tong C L, Qin H L, Wu M N, Wei W X, Wu J S. Long-term field fertilization alters the diversity of autotrophic bacteria based on the ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) large-subunit genes in paddy soil. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(4): 1061-1071.
- [31] 刘琼,魏晓梦,吴小红,袁红朝,王久荣,李裕元,葛体达,吴金水.稻田土壤固碳功能微生物群落结构和数量特征.环境科学,2017,38 (2):760-768.
- [32] 沈萍,陈向东. 微生物学(第二版). 北京:高等教育出版社, 2006: 5-5.
- [33] 吴金水, 葛体达, 祝贞科. 稻田土壤碳循环关键微生物过程的计量学调控机制探讨. 地球科学进展, 2015, 30(9): 1006-1017.
- [34] Hessen D O, Ågren G I, Anderson T R, Elser J J, De Ruiter P C. Carbon sequestration in ecosystems: the role of stoichiometry. Ecology, 2004, 85(5): 1179-1192.
- [35] Feng Y Z, Grogan P, Caporaso J G, Zhang H Y, Liu X G, Knight R, Chu H Y. pH is a good predictor of the distribution of anoxygenic purple phototrophic bacteria in Arctic soils. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 74(6): 193-200.