

DOI: 10.5846/stxb201910082080

赵辉,周运超.不同母岩发育马尾松土壤固氮菌群落结构和丰度特征.生态学报,2020,40(17):6189-6201.

Zhao H, Zhou Y C.Characteristics of structure and abundance of the nitrogen-fixing bacterial community in *Pinus massoniana* soil developed from different parent rocks.Acta Ecologica Sinica,2020,40(17):6189-6201.

不同母岩发育马尾松土壤固氮菌群落结构和丰度特征

赵 辉^{1,2},周运超^{1,*}

1 贵州大学贵州省森林资源与环境研究中心/贵州省高原山地林木培育重点实验室/林学院,贵阳 550025

2 铜仁学院,铜仁 554300

摘要:生物固氮是马尾松林地土壤氮素的重要来源,固氮微生物群落组成和数量的变化对土壤氮素供应和地力维持起重要作用。采用池栽试验,应用荧光定量 PCR(聚合酶链式反应, Polymerase Chain Reaction)技术,借助 Illumina Miseq 高通量测序平台,以 *nifH* 基因为靶标,研究四类母岩(变余砂岩、长石石英砂岩、石英砂岩和玄武岩)发育马尾松土壤固氮菌群落结构和丰度的差异及其与土壤化学性质之间的关系。结果表明:(1)玄武岩土壤的有机碳、全氮、碱解氮、微生物量氮、马尾松株高和地径均显著高于其他母岩($P<0.05$)。(2)四类母岩土壤 *nifH* 基因丰度差异显著,玄武岩土壤 *nifH* 基因丰度分别是变余砂岩、石英砂岩和长石石英砂岩的 3.75 倍、7.89 倍和 4.41 倍。(3)四类母岩土壤固氮菌群落 α 多样性指数(丰富度和多样性)差异显著,且玄武岩显著高于其他母岩。四类母岩发育土壤共获得有效序列 159231 条,分属于 6 个门、14 个纲、41 个目、69 个科和 122 个属。门水平上,变形菌门和蓝藻门为主要优势类群。属水平上,慢生根瘤菌属、根瘤菌属和固氮螺菌属为主要优势属。玄武岩土壤变形菌门、慢生根瘤菌属、根瘤菌属和固氮螺菌属相对丰度显著高于其他母岩。层次聚类和非度量多维尺度(NMDS)分析结果表明,石英砂岩和长石石英砂岩土壤固氮菌群落结构相似,玄武岩与其他母岩固氮菌群落结构差异较大。(4)土壤有机碳、全氮、碱解氮和微生物量氮是固氮菌丰度、 α 多样性及群落结构的主要影响因子。综上,玄武岩土壤肥力高,提高了土壤固氮菌数量和群落多样性,有利于马尾松生长。研究从微生物学角度为马尾松适地造林和氮素调控提供了科学依据。

关键词:母岩;马尾松;固氮微生物;*nifH* 基因;群落结构

Characteristics of structure and abundance of the nitrogen-fixing bacterial community in *Pinus massoniana* soil developed from different parent rocks

ZHAO Hui^{1,2}, ZHOU Yunchao^{1,*}

1 Research Center of Forest Resources and Environment/Provincial Key Laboratory of Forest Cultivation in Plateau Mountainous Areas/College of Forestry in Guizhou Province, Guiyang 550025, China

2 Tongren University, Tongren 554300, China

Abstract: Biological nitrogen fixation is the major source of nitrogen in *Pinus massoniana* areas, and the nitrogen supply and soil fertility maintenance can be largely affected by the composition and quantity of the nitrogen-fixing bacterial community. In this study, pool cultivation experiments were conducted to analyze the relationship between the soil chemical behavior and structure and abundance of the nitrogen-fixing bacterial community in *Pinus massoniana* soil developed from different parent rocks (blastopsammite, quartzose sandstone, feldspathic quartz sandstone, and basalt). The fluorogenic quantitative real-time PCR technique was adopted in the experiments using the high-throughput sequencing platform

基金项目:国家重点研发计划课题子课题(2017YFD0600302);黔科合平台人才项目(2018-5261);贵州省一流学科建设(GNYL[2017]007);贵州省科技计划(黔科合支撑 2018-2305)

收稿日期:2019-10-08; **网络出版日期:**2020-07-10

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yczhou@gzu.edu.cn

Illumina Miseq to target the *nifH* gene. The results showed that: (1) the Basalt had higher amounts of organic carbon, total nitrogen, alkaline nitrogen, and microbial biomass nitrogen with larger plant height and diameter compared with other types of parent rocks ($P < 0.05$). (2) The abundances of the *nifH* gene varied significantly for the four types of parent rocks; more specifically, the *nifH* gene abundances of basalt were 3.75, 7.89, and 4.41 times higher than those of blastopsammite, quartzose sandstone, and feldspathic quartz sandstone, respectively. (3) The diversity index α (abundance and diversity) of the four types of parent rocks was significantly different, and basalt showed a considerably higher α than that of other parent rocks. In total, 159,231 valid sequences, which belong to 6 phyla, 14 classes, 69 orders, and 122 genera, were obtained from the soil of the four parent rocks. Proteobacteria and Cyanobacteria were the dominant phyla, whereas *Bradyrhizobium*, *Calothrix*, *Rhizobium*, and *Azospirillum* were the dominant genera. Compared with other parent rocks, basalt had higher abundances of Proteobacteria, *Calothrix*, *Rhizobium*, and *Azospirillum*. The results from hierarchical clustering and non-metric multidimensional scaling (NMDS) showed that for the nitrogen-fixing bacterial community, quartzose sandstone and feldspathic quartz sandstone shared a similar structure, whereas basalt had a different structure compared with the other types of parent rocks. (4) The amounts of organic carbon, total nitrogen, alkaline nitrogen, and microbial biomass nitrogen were the main factors for the abundance of nitrogen-fixing bacteria, the diversity of α , and the structure of the bacterial community. In general, basalt soil had a high fertility, increased the amount of nitrogen-fixing bacteria, and enhanced the diversity of the bacterial community, thereby facilitating the growth of *Pinus massoniana*. Our study provides a scientific basis for selecting the appropriate growth environment and nitrogen adjustment for *Pinus massoniana* from a microbiological point of view.

Key Words: parent rock; *Pinus massoniana*; nitrogen-fixing microbe; *nifH* gene; community structure

氮(N)在植物生长发育过程中具有不可替代的作用,它是合成植物体内蛋白质和核酸的必需元素,同时其自身也参与植物信号的传递^[1]。生物固氮是指将大气中的 N_2 转化为可被植物吸收利用的含氮化合物的过程,每年大约有 50% 的大气氮通过该途径进入生态系统^[2]。生物固氮与具有生理功能的需氧和厌氧微生物密切相关^[3]。目前,已经发现 60 多个属的固氮微生物,主要包括固氮菌属(*Azobacter*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)等^[4]。固氮菌数量和群落结构对土壤固氮速率和氮循环有直接的影响,可作为衡量土壤质量的重要指标^[5]。生物固氮是由固氮酶催化,而固氮酶是一种能够将分子氮还原成氨的酶,有两个多亚基的金属蛋白酶组成,分别为 *nifD*, *nifK* 基因编码的钼铁蛋白和 *nifH* 基因编码的铁蛋白^[6]。其中, *nifH* 基因是系统进化过程最古老的功能基因之一,在进化过程中与 16SrDNA 保持一致^[7]。因此 *nifH* 作为生物标记基因被广泛用于研究固氮微生物群落结构^[8]。

马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)是我国特有的针叶树种之一,由于其适应性强和耐干旱瘠薄等特点,广泛分布于我国南方地区,在我国生态环境建设和林业产业发展中发挥着重要作用^[9]。因马尾松属于速生林,在生长过程中对土壤氮素的需求量较大。而目前在马尾松生长的土壤环境中,有限的氮素利用率成为限制其林木速成丰产的关键因素^[10]。对于很少有氮素施入的马尾松林而言,生物固氮是维持马尾松林生长的主要氮源,对马尾松人工林速生丰产及地力维持具有重要作用。然而,由于马尾松人工林主产区土壤母岩类型多样,并且在造林过程中没有做到因地制宜,因而导致大量低产林存在。因此,通过对不同母岩发育马尾松土壤固氮菌群落结构和丰度及其影响因素进行研究,对了解母岩发育马尾松土壤生物固氮及调节土壤氮素供应具有极其重要的意义。

土壤母质(岩)是岩石及矿物的风化产物,决定着土壤的形成及发育,而不同母岩发育土壤自身养分的差异会引起土壤微生物群落结构的变化^[11],并对植物生长发育有重要影响。相关研究认为,土壤固氮微生物群落受到非生物和生物因素影响,非生物因子有土壤 pH^[12]、有效性氮^[13]、土壤质地^[14]和土壤类型等^[15];生物

因子有植被类型等^[16],这些因素造成固氮微生物群落结构和多样性在不同母岩和植被下差异较大。目前,不同母岩发育土壤马尾松人工林的研究主要集中在林木生长^[17]、酶活性^[18]和土壤养分^[19]等方面。关于亚热带地区不同母岩发育马尾松土壤固氮菌群落结构、多样性和丰度的研究未见报道。为此,本文运用 Illumina MiSeq 高通量测序技术和荧光定量 PCR 技术对亚热带地区主要母岩发育马尾松土壤固氮菌群落结构及丰度进行了研究,探讨土壤固氮菌群落结构和丰度在不同母岩发育土壤中的分布特征及其与土壤环境因子的关系,以揭示不同母岩发育土壤固氮能力及固氮菌生态功能,从固氮微生物角度来分析不同母岩土壤质量状况,为马尾松人工林适地造林及速生丰产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况及试验设计

研究区位于贵州大学造林生态园(106°40'42"E,26°25'41"N),海拔 1100 m,属于典型中亚热带季风气候,年相对湿度 81%,年平均气温 14.9℃,无霜期 285 d 左右,年平均日照总数为 1274.2 h。

为尽量减少气候和群落植被等外界环境因子差异对试验造成的影响,采取了盆栽试验。选取贵州省马尾松造林面积分布较广泛的土体为研究对象,主要发育于四类母岩,分别为变余砂岩(Blastopsammite)、长石石英砂岩(Feldspathic quartz sandstone)、石英砂岩(Quartz sandstone)和玄武岩(Basalt)。四类母岩发育形成的土壤过 1 cm 筛后,分别装入长×宽×深=5.0 m×1.2 m×0.5 m 石框内作为 1 个试验小区,每类母岩土壤重复 3 次,共计 12 个试验小区,每小区面积为 6 m²。土壤基本情况见表 1。于 2014 年 4 月向小区内移栽生长发育良好且大小均一的 1 年生马尾松实生苗木,每小区 36 株。试验期间管理方式一致,均未施肥。

表 1 不同土壤母岩土壤基本情况

Table 1 General information of the soils developed from different parent rocks

母岩 Parent rock	pH	土壤有机碳/(g/kg) Soil organic carbon	全氮/(g/kg) Total nitrogen	质地 Texture	土壤容重/(g/cm ³) Soil bulk density
BL	5.81	15.6	0.74	壤质粘土	1.08
FQS	5.32	9.20	0.59	壤质粘土	1.35
QS	5.54	14.25	0.93	壤质粘土	1.21
BA	5.73	23.40	1.16	砂质粘壤土	0.92

BL:变余砂岩 Blastopsammite;FQS:长石石英砂岩 Feldspathic quartz sandstone;QS:石英砂岩 Quartz sandstone;BA:玄武岩 Basalt

1.2 样品采集

2017 年 7 月进行土壤样品采集。在每个试验小区内沿 S 形样线用直径 5 cm 土钻均匀采取 5 个 0—10 cm 土壤样品,混合成 1 个土样,用低温冰盒保存并迅速带回实验室。土样在室内去除石块和植物根系等杂物并过 2 mm 筛后,最终分为三份,一份保存于-80℃冰箱,用于 *nifH* 基因群落结构和丰度分析;一份 4℃冰箱保存,用于土壤微生物生物量碳和氮测定;一份用于土壤铵态氮和硝态氮测定,余下部分室内风干,过筛和研磨用于土壤化学指标测定。

1.3 测定方法

1.3.1 马尾松株高和地径测定

2017 年 7 月对马尾松株高和地径进行测定。株高采用钢卷尺测定,地径采用游标卡尺测定。

1.3.2 土壤化学性质及微生物量碳氮测定

土壤化学性质采用鲁如坤方法测定^[20];土壤 pH 采用电位法;有机碳采用重铬酸钾氧化法;全氮采用凯氏定氮法;碱解氮采用碱解扩散法;铵态氮采用靛酚蓝比色法;硝态氮采用酚二磺酸比色法;速效磷采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法;速效钾采用乙酸铵提取-火焰光度法。土壤微生物量碳和氮采用吴金水方法测定^[21];微生物量碳采用氯仿熏蒸-容量分析法,微生物量氮采取氯仿熏蒸-茚三酮比色法。

1.3.3 土壤 DNA 提取及高通量测定

称取 0.5 g 土壤,按照 E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit (Omega, GA, USA) 试剂盒操作步骤提取土壤 DNA。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,用核酸定量仪 (Nanodrop-NC2000) 检测 DNA 浓度和纯度。

采用引物 *nifH-F* (5'-AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC-3') 与 *nifH-R* (5'-TTGTTSGCSGCRTACATSGCCATCAT-3') 扩增固氮菌 *nifH* 基因^[22]。PCR 体系 (25 μ L): 5 $\times$ ExTaq 缓冲液 5.0 μ L, dNPT (2.5 μ mol/L) 2.0 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.0 μ L, DNA 模板 2.0 μ L (1—10 ng), ExTaq (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 最后用超纯水 (ddH₂O) 补至 25 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。样品送至上海派森诺测序公司 (Personalbio, China), 运用 Illumina MiSeq 测序平台进行测序。

1.3.4 *nifH* 基因丰度测定

利用荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术检测 *nifH* 基因拷贝数, 反应在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪 (ABI, CA, USA) 上进行, 反应引物同 1.3.3 所示。反应体系为: 2 $\times$ SYBR real-time PCR premixture (Biotek, Beijing) 10 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, DNA 模板 1.0 μ L (1—10 ng), 最后用超纯水 (ddH₂O) 补至 20 μ L。荧光定量 PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。按照 Poly 方法^[23], 获得含有 *nifH* 基因的重组质粒, 分别以 10 倍梯度稀释基因重组质粒得到标准曲线。并根据标准曲线计算基因丰度, *nifH* 丰度最终被计算为每克干土的拷贝数。

1.4 数据分析

利用 FLASH 软件对通过质量初筛的双端序列根据重叠碱基进行配对连接, 从而获得每个样本的有效序列。通过 QIIME 软件调用 USEARCH 检查并剔除嵌合体序列。将优质序列聚类成操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU), 阈值设置为 97%, 并选取每个 OTU 中丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列。应用 RDP-classifier 在 GenBank 中对 OTU 进行分类注释, 统计各样品门和属水平上群落组成; 使用 QIIME 软件, 对 Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数进行计算。

采用 SPSS21.0 统计软件, 通过单因素方差分析 (one-way ANOVA, $n=3$, $P<0.05$) 和多重比较检验四类母岩发育土壤化学性质、马尾松株高、地径、固氮菌 α 多样性指数、丰度和群落组成相对丰度的差异显著性 ($P<0.05$); 相关性分析用 SPSS21.0 和 R 软件完成; 固氮菌群落结构聚类分析、非度量多维尺度分析 (Non-metric multidimensional scaling, NMDS) 和冗余分析 (Redundancy analysis, RDA) 用 R 软件完成。

2 结果与分析

2.1 马尾松株高和地径

四类母岩马尾松株高和地径之间差异显著 ($P<0.05$) (图 1)。BL、FQS、QS 和 BA 发育土壤下的马尾松株高 (地径) 分别为 282.30 cm (2.78 cm)、292.93 cm (2.84 cm)、305.17 cm (3.05 cm) 和 340.83 cm (3.36 cm), 其中 BA 土壤下马尾松株高和地径显著高于 BL 和 FQS ($P<0.05$)。由此可知, BA 发育的土壤有利于马尾松生长。

2.2 土壤化学性质和微生物量碳氮

不同母岩马尾松土壤化学性质如表 2 所示。四类母岩发育马尾松土壤均呈弱酸性 ($\text{pH}<6.5$), QS 土壤 pH 最低为 4.71, 显著低于其他母岩 ($P<0.05$)。土壤有机碳、全氮和碱解氮含量均是 BA 最高, 分别为 28.34 g/kg、1.32 g/kg 和 168.54 mg/kg, 并与其他母岩差异显著 ($P<0.05$)。BA 土壤铵态氮含量最低, 硝态氮含量最高, 分别与其他母岩差异不显著。BL 土壤速效磷含量最高, 速效钾含量最低。

不同母岩土壤微生物量碳和氮差异显著 ($P<0.05$) (图 2), 且微生物量碳含量高于微生物量氮。BL 土壤微生物量碳含量显著高于其他母岩 ($P<0.05$), BA 土壤微生物量碳含量最低, 为 147.13 mg/kg, 但其土壤微生物量氮含量显著高于其他母岩 ($P<0.05$)。由此可知, 不同母岩发育马尾松土壤微生物量碳和氮呈现出不同的变化趋势。

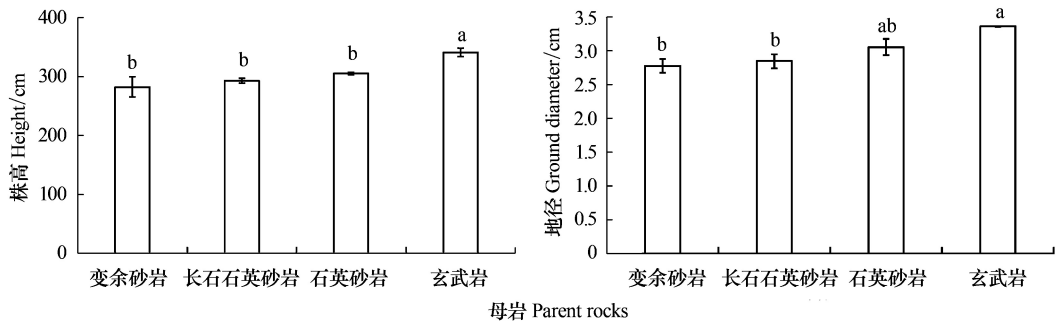


图 1 不同母岩发育土壤马尾松株高和地径

Fig.1 Height and ground diameter of *Pinus massoniana* soils developed from different parent rocks

BL:变余砂岩 Blastosammite;FQS:长石石英砂岩 Feldspathic quartz sandstone;QS:石英砂岩 Quartz sandstone;BA:玄武岩 Basalt

表 2 不同母岩发育马尾松土壤化学性质

Table 2 Chemical properties of *Pinus massoniana* soils developed from different parent rocks

母岩 Parent rock	pH	土壤有机碳 SOC/ (g/kg)	全氮 TN/ (g/kg)	碱解氮 AN/ (g/kg)	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N /(mg/kg)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N /(mg/kg)	速效磷 AP /(mg/kg)	速效钾 AK /(mg/kg)
BL	5.30±0.19a	16.27±1.05bd	0.82±0.06b	91.31±6.62b	3.91±0.33a	1.47±0.04a	1.86±0.11ab	90.79±3.44c
FQS	5.28±0.24ac	12.29±0.85c	0.60±0.04c	90.56±2.45b	3.98±0.37a	1.46±0.16a	1.51±0.09a	110.62±4.13bd
QS	4.71±0.10b	18.55±0.41b	0.57±0.03c	102.38±4.33b	3.16±0.18a	1.42±0.16a	1.19±0.16b	151.78±2.54a
BA	5.32±0.07a	28.34±1.46a	1.32±0.07a	168.54±5.73a	3.11±0.58a	1.59±0.14a	1.27±0.24b	117.44±2.55b

表中数值为平均值±标准差(n=3),同列数值不同小写字母表示差异显著(P<0.05);SOC:土壤有机碳 Soil organic carbon;TN:全氮 Total nitrogen;AN:碱解氮 Nitrogen hydrolysis;NH₄⁺-N:铵态氮 Ammonium nitrogen;NO₃⁻-N:硝态氮 Nitrate nitrogen;AP:速效磷 Available phosphorus;AK:速效钾 Available potassium

2.3 固氮微生物 nifH 基因丰度

不同母岩马尾松土壤固氮微生物 *nifH* 基因丰度差异显著(P<0.05)。由图 3 可见,四类母岩土壤 *nifH* 基因丰度范围为 0.19×10⁵—1.5×10⁵copies/g 干土。BA 土壤 *nifH* 基因丰度显著高于其他三类母岩(P<0.05),而 BL、FQS 和 QS 之间差异不显著(P>0.05),大小顺序为 BA>BL>QS>FQS。

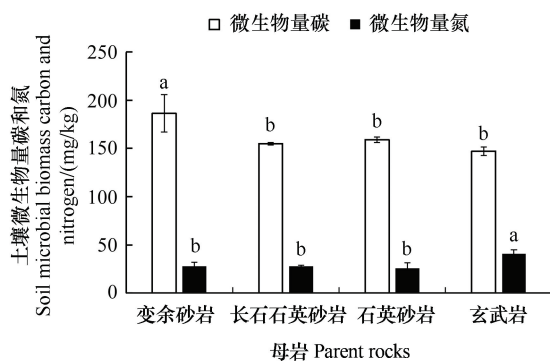


图 2 不同母岩发育马尾松土壤微生物量碳和氮

Fig. 2 Microbial biomass carbon and nitrogen of *Pinus massoniana* soils developed from different parent rocks

不同小写字母表示不同处理间差异达到显著水平(P<0.05)

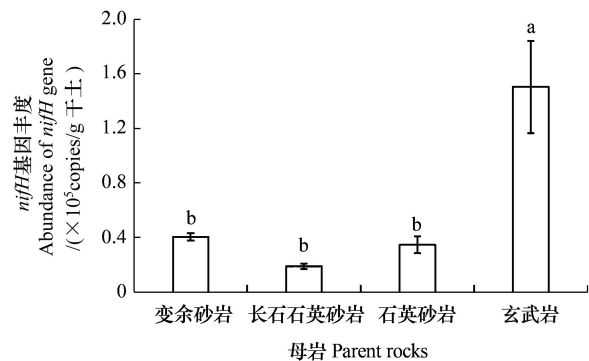


图 3 不同母岩发育马尾松土壤样品 nifH 基因丰度

Fig. 3 Abundance of *nifH* gene in *Pinus massoniana* soils developed from different parent rocks

不同小写字母表示不同处理间差异达到显著水平(P<0.05)

为明确不同母岩土壤固氮微生物 *nifH* 基因丰度差异的影响因素,由 *nifH* 基因丰度与土壤化学性质、马尾松株高和地径进行相关性分析。结果表明(图 4),*nifH* 基因丰度分别与土壤有机碳、全氮、碱解氮、微生物量氮含量和株高之间呈极显著正相关关系($P<0.01$),与地径呈显著正相关关系($P<0.05$)。可知,固氮菌数量与土壤氮素供应和马尾松生长之间关系密切。

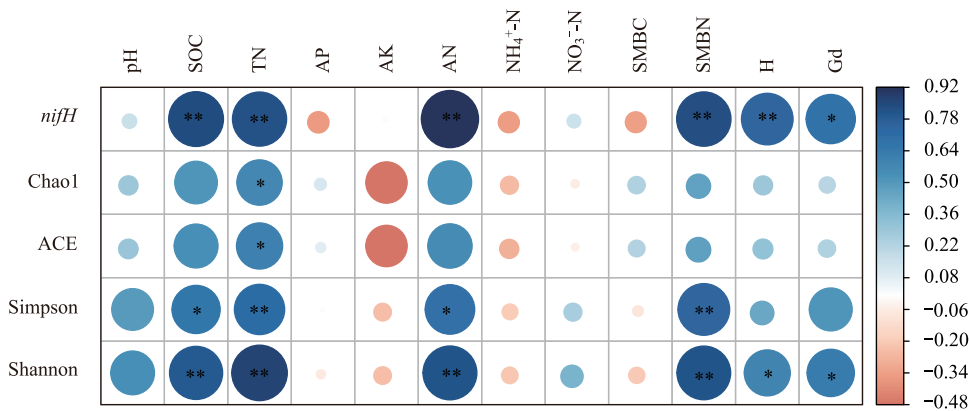


图 4 群落多样性指数、*nifH* 基因丰度与土壤化学性质、株高和地径相关性

Fig.4 Correlation between community diversity index, *nifH* gene abundance and soil chemical properties, Height, ground diameter

* 和 * * 分别表示相关性显著在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平。SMBC:土壤微生物量碳 Soil microbial biomass carbon;SMBN:土壤微生物量氮 Soil microbial biomass nitrogen;H:株高 Height;Gd:地径 Ground diameter;*nifH*:*nifH* 基因丰度 Abundance of *nifH* gene;Chao1:Chao1 指数 Chao1 index;ACE:ACE 指数 ACE index;Simpson:辛普森指数 Simpson index;Shannon:香农指数 Shannon index

2.4 固氮微生物测序结果和 α 多样性

利用 Illumina MiSeq 平台对固氮微生物 *nifH* 基因测序分析,BL、FQS、QS 和 BA 土壤中获得质控后序列数分别为 41338、34229、38223 和 45441 条(表 3)。把相似度水平 $\geq 97\%$ 的序列聚为一个操作分类单元(OTU),其中 BA 土壤含有的 OTUs 数最多(2206 个),FQS 土壤 OTUs 数最少(1471 个)。由单因素方差分析可知(表 3),不同母岩发育马尾松土壤 α 多样性指数差异显著($P<0.05$)。四类母岩土壤 α 多样性指数变化趋势一致,大小顺序均为 BA>BL>QS>FQS。说明 BA 发育马尾松土壤固氮菌多样性相对更为丰富。

相关性分析结果表明(图 4),Chao1 指数和 ACE 指数与土壤全氮呈显著正相关关系($P<0.05$)。Simpson 指数与土壤有机碳($r=0.651, P<0.05$)和碱解氮($r=0.688, P<0.05$)均呈显著正相关关系;与全氮($r=0.709, P<0.01$)和微生物量氮($r=0.750, P<0.01$)呈极显著正相关关系。Shannon 指数与土壤有机碳($r=0.791, P<0.01$)、全氮($r=0.864, P<0.01$)、碱解氮($r=0.814, P<0.01$)和微生物量氮($r=0.808, P<0.01$)均呈极显著正相关关系,与株高($r=0.594, P<0.05$)和地径($r=0.628, P<0.05$)呈显著正相关关系。

表 3 不同母岩发育马尾松土壤固氮菌 α 多样性

Table 3 Alpha Diversity of nitrogen-fixing microbial communities in *Pinus massoniana* soils developed from different parent rocks

母岩 Parent rock	序列 Reads	操作分类单元 Operational taxonomic Unit(OTU)	Chao1 指数 Chao1 index	ACE 指数 ACE index	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index
BL	41338±989b	2053±126ac	1354.61±43.66ac	1359.78±44.14ac	6.90±0.15b	0.96±0.01ab
FQS	34229±275c	1471±60b	926.67±76.29b	926.78±44.16b	6.52±0.27b	0.94±0.01b
QS	38223±1371bd	1561±60b	972.68±68.91b	973.54±40.59b	6.53±0.55b	0.95±0.02b
BA	45441±1678a	2206±48a	1392.65±206.74a	1424.14±210.30a	7.64±0.13a	0.98±0.01a

不同小写字母表示不同处理间差异达到显著水平($P<0.05$)

2.5 固氮微生物群落组成

通过对样品获得的 OTUs 进行归类,得到 6 个门、14 个纲、41 个目、69 个科和 122 个属。在门水平上,分

别为变形菌门(Proteobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)和浮霉菌门(Planctomycetes)(图5)。变形菌门和蓝藻门为主要优势类群,相对丰度分别为84.05%—94.71%和0.57%—3.94%。蓝藻门和疣微菌门在四类母岩发育马尾松土壤之间差异极显著($P<0.01$),其中蓝藻门相对丰度在BL土壤最高。变形菌门、厚壁菌门和放线菌门在四类母岩土壤之间差异显著($P<0.05$)。变形菌门相对丰度在BA土壤显著高于其他母岩($P<0.05$);厚壁菌门相对丰度在FQS土壤最高(1.19%),QS土壤最低(0.02%);放线菌门相对丰度在QS土壤最高(0.17%),FQS土壤最低(0.04%);疣微菌门在QS土壤不存在;浮霉菌门仅在QS土壤存在,相对丰度为0.02%。

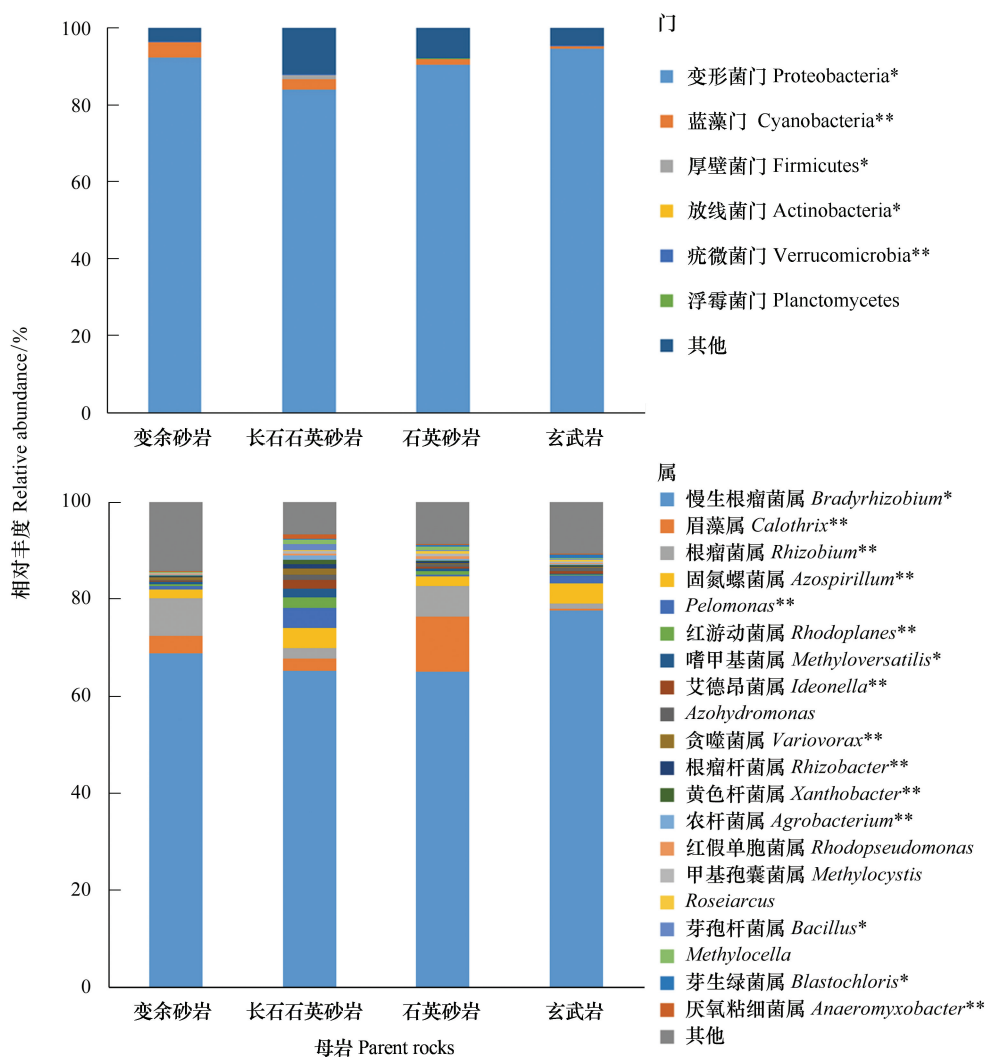


图5 不同母岩发育马尾松土壤固氮菌门和属水平组成

Fig.5 The nitrogen-fixing microbial community composition at the phylum and genus levels in *Pinus massoniana* soils developed from different parent rocks

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

在属水平上,将平均相对丰度 $<0.3\%$ 类群归类为其他,得到20个类群(图5)。其中,慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、眉藻属(*Calothrix*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)和固氮螺菌属(*Azospirillum*)为主要优势类群,相对丰度分别为65.13%—77.78%、0.26%—11.24%、1.14%—7.72%和1.71%—4.14%。慢生根瘤菌属在四类母岩发育土壤之间差异显著($P<0.05$)。眉藻属、根瘤菌属和固氮螺菌属在四类母岩发育土壤之间差异极显著($P<0.01$)。慢生根瘤菌属和固氮螺菌属相对丰度均在BA土壤最高;眉藻属相对丰度在QS土壤最高,BA土

壤最低;根瘤菌属相对丰度在 BL 土壤最高,BA 土壤最低。

2.6 固氮菌群落结构及其与土壤化学性质的关系

基于 OTU 层次聚类分析结果显示(图 6),四类母岩发育马尾松土壤固氮菌群落结构差异明显,相同处理的 3 个重复都聚类在一起。NMDS 分析进一步证实了四类母岩发育马尾松土壤固氮菌群落结构差异明显(图 6)。四类母岩土壤固氮菌群落结构在 NMDS1 和 NMDS2 发生明显分离,分布在不同象限内。其中,BA 与 FQS、BL 和 QS 距离较远,说明 BA 土壤固氮菌群落结构与其他母岩差异较大;FQS 和 QS 相距较近,说明这两类母岩发育土壤固氮菌群落结构相似度较高。

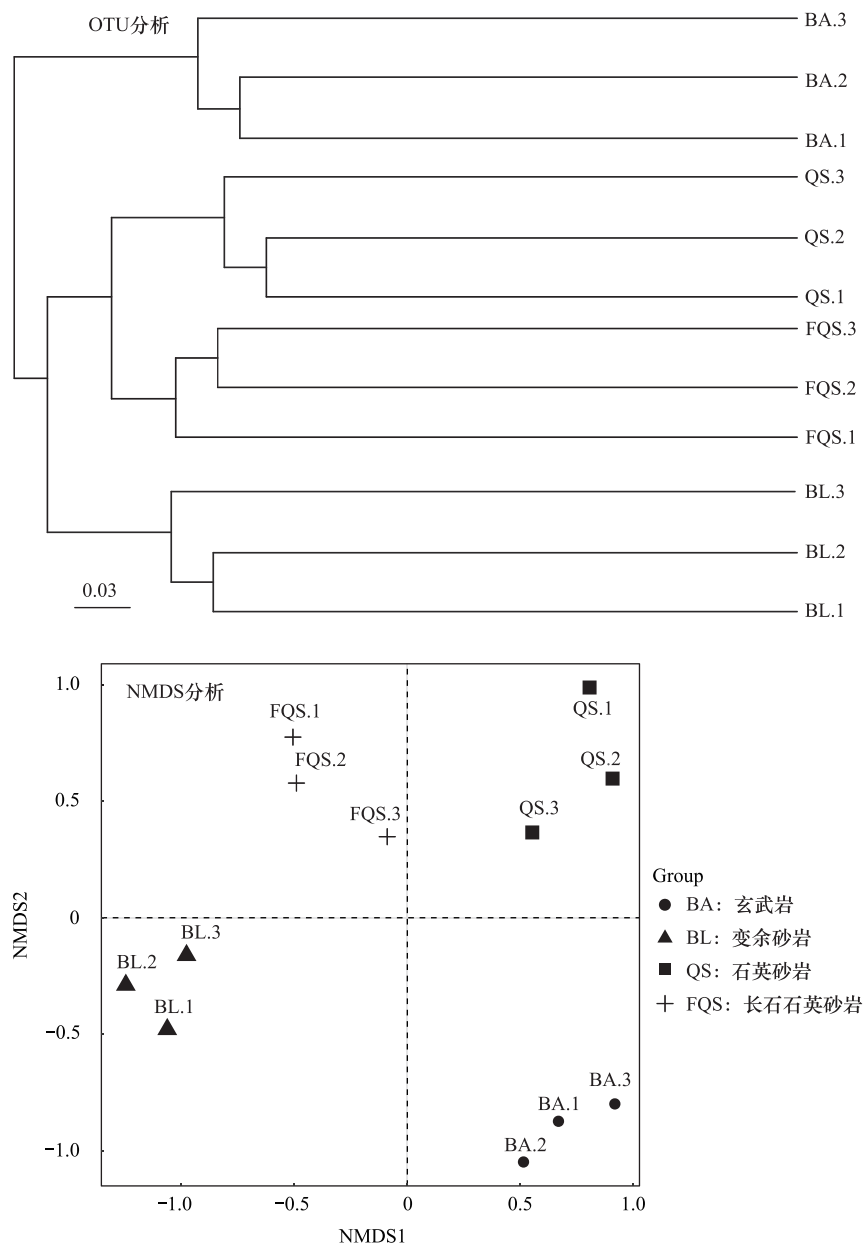


图 6 不同母岩土壤固氮菌群落结构的层次聚类树和 NMDS 分析

Fig.6 Hierarchical clustering tree and nonmetric multidimensional scaling of the nitrogen-fixing microbial community structure in *Pinus massoniana* soils developed from different parent rocks

为进一步分析土壤化学性质对固氮菌群落结构的影响,对固氮菌群落结构与土壤化学性质进行冗余分析(图 7)。结果表明,第 1 轴(Axis 1)和第 2 轴(Axis 2)分别解释了 46.99%和 30.56%的变异,两者累计解

释变异量为 77.55%。由此可知,前两轴能够很好地反映土壤固氮菌群落组成与土壤化学成分之间的关系。土壤有机碳、全氮、碱解氮和微生物量氮对固氮菌群落有极显著影响。

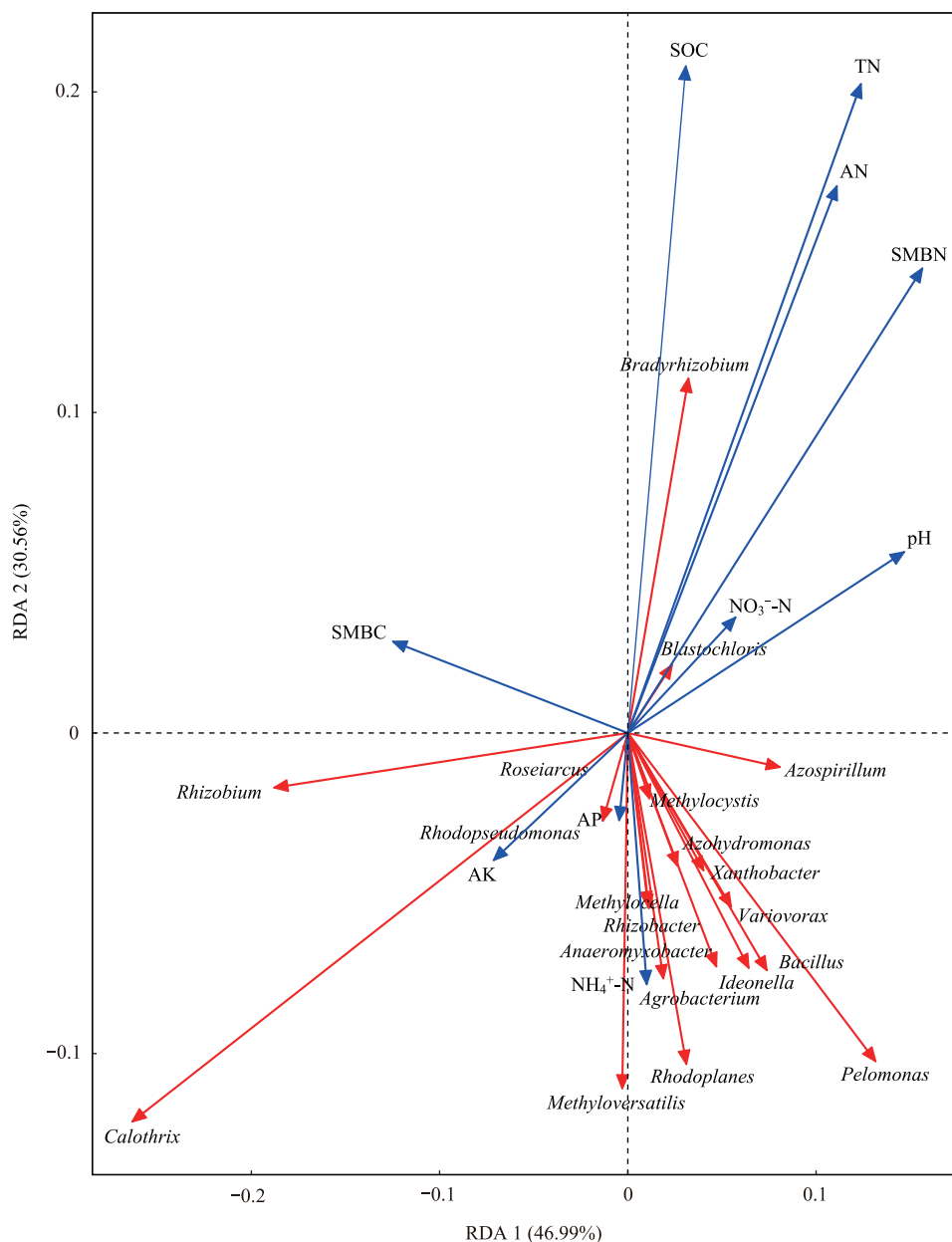


图 7 属水平固氮菌群落和土壤化学性质的冗余分析

Fig.7 Redundancy analysis between the nitrogen-fixing microbial community structure at the genus level and soil chemical properties

3 讨论

3.1 不同母岩发育马尾松土壤对固氮菌丰度和多样性的影响

土壤能够为微生物生长提供所需养分,土壤养分的差异直接导致微生物数量和群落结构发生变化^[24]。闫小莉和王德炉^[25]研究认为,土壤母岩对其发育土壤理化性质有显著影响。因此,母岩也将间接对土壤微生物种群数量和结构产生重要影响。本研究中四类母岩发育马尾松土壤固氮菌丰度与 α 多样性指数变化规律相同,均是玄武岩土壤显著高于其他母岩。大量研究表明,土壤有机碳^[26]、氮^[27-28]和根系分泌物^[29]是影响

nifH 基因丰度的主要因素。Herbert^[30] 研究认为,微生物固氮所需能量主要来源于土壤有机碳,每固定一分子氮将需要 16 个 ATP。Coelho 等^[27] 研究认为,土壤氮含量增加将导致 *nifH* 基因丰度降低;然而 Juraeva 等^[28] 研究认为,*nifH* 基因丰度随土壤氮含量增加而增加。杨亚东等^[29] 研究认为,植物生长越旺盛,根系分泌物越多,越有利于固氮菌生长。Nelson 和 Mele^[31] 研究表明,土壤质地对固氮菌数量影响较大,黏质土壤比沙质土壤具有更多的 *nifH* 基因丰度,与本研究结果相似。本研究中玄武岩土壤 *nifH* 基因丰度显著高于其他母岩,这可能由于玄武岩土壤的有机碳和氮养分含量高,马尾松生长快,根系分泌物代谢物较多,为固氮菌生长提供较多的碳源和氮源;而变余砂岩、石英砂岩和长石石英砂岩土壤养分含量低,不能为固氮菌生长提供充足的碳源和养分,因此造成固氮微生物数量较少。Huang 等^[32] 研究认为,植物会对土壤理化性质产生直接或间接的影响。与栽种前相比,本研究中四类母岩马尾松生长的土壤 pH 均有所下降,这可能由于马尾松生长过程中根系分泌物或针叶在分解过程中产生酸性物质所致。Silva 等^[33] 研究认为,土壤 pH 与 *nifH* 基因丰度有显著相关性。然而,本研究中土壤 pH 与 *nifH* 基因丰度没有显著相关性,与杨亚东等^[29] 研究结果一致;但是土壤 pH 在不同母岩发育土壤之间差异显著,因此土壤 pH 可能通过改变土壤理化性质^[34],间接对固氮菌数量产生一定影响。

微生物 α 多样性指数是评价土壤微生物群落多样性的重要指标,多样性指数越高表明微生物群落丰富度和多样性越高,土壤肥力越高,土壤生态环境越稳定^[35]。Chao1 或 ACE 指数越大,表明群落丰富度越高。Simpson 和 Shannon 指数越高表明群落多样性越高。周燕等^[36] 研究认为,固氮微生物多样性与植物凋落物和根系分泌物关系密切。本研究表明,玄武岩土壤固氮菌 α 多样性指数均显著高于其他母岩,表明玄武岩土壤固氮菌的丰富度和多样性较高,可能由于马尾松生长较快,凋落物和根系分泌物增多,导致养分归还和转化速率加快^[37],土壤可利用养分含量增加,有利于固氮微生物生长繁殖。本研究结果进一步佐证了土壤肥力(养分)增高可促进土壤微生物多样性升高的论点^[38]。石英砂岩和长石石英砂岩马尾松由于生长缓慢,凋落物和根系分泌物较少,限制了固氮菌生长,因而导致固氮微生物丰富度和多样性指数较低。

本研究中土壤有机碳、全氮和碱解氮与 *nifH* 基因丰度和多样性指数之间呈显著正相关性关系,进一步表明不同母岩发育马尾松土壤有机碳、全氮和碱解氮含量差异是影响固氮菌数量和多样性的重要因素。有研究表明土壤氮素含量是微生物生长的限制因子,其与微生物数量和群落组成关系密切^[39]。然而,本研究中土壤铵态氮和硝态氮含量与固氮菌丰度和多样性指数并无显著相关性,这和何冬华^[40] 等研究结果一致,说明土壤环境因子对固氮菌的影响较为复杂。

3.2 固氮菌群落与土壤质量之间的关系

固氮菌群落组成对土壤地力维持和植物生长有重要影响^[41]。Poly 等^[23] 研究表明,土壤类型和养分状况对固氮菌群落结构影响较大。本研究中四类母岩土壤优势门和属类群相似,但不同母岩中优势类群相对丰度存在显著差异(图 5);层次聚类 and NMDS 分析也表明,四类母岩发育土壤固氮菌群落结构分离明显,因此母岩对土壤固氮菌群落结构有显著影响。本研究中变形菌门和蓝藻门是主要优势类群,且在不同母岩发育土壤中差异显著。相关研究认为,变形菌门广泛分布于土壤中且有较高的相对丰度,属于异养型微生物,具有嗜营养特点,与土壤有机碳含量关系紧密,可用来指示土壤肥力状况^[42-43]。Anderson 等^[44] 研究表明,植物可以增强母岩土壤风化速率和促进养分释放。玄武岩土壤在有机碳含量高和马尾松生长旺盛共同作用下促进变形菌门菌群生长,导致变形菌门相对丰度显著高于其他母岩。其中,慢生根瘤菌属相对丰度在玄武岩土壤最高;然而眉藻属相对丰度在玄武岩土壤最低;可知变形菌门中不同属群对相同环境因子的响应存在差异,具有各自的生态位。蓝藻门为水生环境中优势固氮类群,在湿润环境下生长较好^[45-46]。目前,关于蓝藻门对氮固定的贡献大小一直未达成共识^[47]。Beversdorf 等^[48] 研究认为蓝藻门对氮固定的贡献较大,然而 Ferber 等^[49] 研究认为蓝藻门对氮的固氮在整个环境氮库中贡献较小。本研究中蓝藻门相对丰度在玄武岩土壤最低,变余砂岩土壤最高;可能是由于玄武岩土壤为砂质粘壤土^[19],土壤透水好,抑制了蓝藻门固氮菌的生长;变余砂岩土壤为壤质粘土^[19],土壤透水性差,且 7 月雨水较多,土壤易于板结和积水,有利于其生长繁殖;同时变余砂岩土

壤蓝藻门相对丰度高导致铵态氮含量较高,然而铵态氮含量与其他母岩差异不显著,可见蓝藻门在变余砂岩土壤中可能对氮固定的贡献不大。厚壁菌门具有寡营养特点,同时分泌大量有害物质,干扰植物正常氮素代谢,不利于植物生长^[13]。厚壁菌门相对丰度在长石石英砂岩土壤最高,因此推测长石石英砂岩马尾松生长缓慢可能与该菌群有关。疣微菌门极富生态多样性,对环境耐受能力强,具有降解烃类能力^[50]。在马尾松生长过程中,疣微菌门固氮的同时所降解的烃类物质可能是马尾松所产生的次级代谢产物,次级代谢产物的积累将不利于其生长^[51]。本研究中疣微菌门相对丰度在玄武岩和长石石英砂岩土壤较高,变余砂岩土壤较少,石英砂岩土壤未检测到。因此,不同母岩发育土壤中疣微菌门的减少或消失,可能也是抑制马尾松生长的一个重要因素。

本研究发现,土壤有机碳、全氮、碱解氮和微生物量氮是固氮菌群落结构的主要影响因素。Orr 等^[52]研究也认为土壤有机碳和氮对固氮菌群落结构有显著影响,同时有机碳、全氮和碱解氮相互之间有显著相关性;由此可知,固氮菌群落结构可能由几个关联性较强的化学指标共同进行调控。综上所述,玄武岩土壤有机碳、全氮、碱解氮和微生物量氮显著高于其他母岩,土壤肥力较高,有利于马尾松生长,对优化固氮菌群落结构和促进土壤氮固定具有重要作用。今后研究中需要开展相应的野外试验,与池栽试验进行相互印证;同时对参与马尾松凋落物分解和拮抗致害真菌等重要微生物功能类群进行深入的研究,有利于进一步解释不同母岩发育马尾松土壤质量差异的微生物机理,为马尾松适地造林提供充分的理论依据。

4 结论

四类母岩土壤固氮菌(*nifH*)基因丰度和群落 α 多样性指数差异显著,表现为玄武岩>变余砂岩>石英砂岩>长石石英砂岩。变形菌门和蓝藻门相对丰度占到固氮菌总量的 87.99%—95.29%,是四类母岩土壤共有的优势群落,其中玄武岩土壤所占比例最高。厚壁菌门和疣微菌门通过自身代谢产物对马尾松生长具有重要影响。土壤有机碳、全氮和碱解氮是影响四类母岩土壤固氮菌丰度、群落结构和 α 多样性的主要因素。因此,马尾松在不同母岩发育土壤栽种时,应根据母岩特性采取有效措施,改善土壤养分状况,优化土壤固氮菌群落结构,提高土壤固氮能力,实现人工林速生丰产及可持续经营。

参考文献(References):

- [1] Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(5): 263-276.
- [2] Galloway J N, Dentener F J, Capone D G, Boyer E W, Howarth R W, Seitzinger S P, Asner G P, Cleveland C C, Green P A, Holland E A, Karl D M, Michaels A F, Porter J H, Townsend A R, Vöosmarty C J. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 2004, 70(2): 153-226.
- [3] Dos Santos P C, Fang Z, Mason S W, Setubal J C, Dixon R. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genome. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 162.
- [4] 彭卫福. 土壤肥力对水稻氮素利用效率和氮循环相关微生物的影响[D]. 南昌: 江西农业大学, 2017.
- [5] 李建宏, 李雪萍, 卢虎, 姚拓, 王理德, 郭春秀, 师尚礼. 高寒地区不同退化草地植被特性和土壤固氮菌群特性及其相关性. *生态学报*, 2017, 37(11): 3647-3654.
- [6] Rees D C, Akif Tezcan F, Haynes C A, Walton M Y, Andrade S, Einsle O, Howard J B. Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2005, 363(1829): 971-984.
- [7] 张晶, 张惠文, 李新宇, 苏振成, 张成刚. 土壤微生物生态过程与微生物功能基因多样性. *应用生态学报*, 2006, 17(6): 1129-1132.
- [8] Tang H, Yu M, Wang Y Y, Han X W, Wang X G, Jin W, Chi F Q, Wei D. Effects of long-term fertilization on *nifH* gene diversity in agricultural black soil. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(11): 2659-2666.
- [9] 洪伟, 吴承祯. 马尾松人工林经营模式及其应用. 北京: 中国林业出版社, 1999: 1-5.
- [10] Sheng R, Qin H L, O'Donnell A G, Huang S, Wu J S, Wei W X. Bacterial succession in paddy soils derived from different parent materials. *Journal of Soils and Sediments*, 2015, 15(4): 982-992.
- [11] Wang Y S, Li C N, Kou Y P, Wang J J, Tu B, Li H, Li X Z, Wang C T, Yao M J. Soil pH is a major driver of soil diazotrophic community assembly in Qinghai-Tibet alpine meadows. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 115: 547-555.

- [12] Jung J, Yeom J, Kim J, Han J, Lim H S, Park H, Hyum S, Park W. Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils. *Research in Microbiology*, 2011, 162(10): 1018-1026.
- [13] Sun L, Gao J S, Huang T, Kendall J R A, Shen Q R, Zhang R F. Parental material and cultivation determine soil bacterial community structure and fertility. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(1): 1-10.
- [14] Hayden H L, Drake J, Imhof M, Oxley A P A, Norng S, Mele P M. The abundance of nitrogen cycle genes *amoA* and *nifH* depends on land-uses and soil types in South-Eastern Australia. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(10): 1774-1783.
- [15] Wang Q, Quensen III J F, Fish J A, Lee K T, Sun Y N, Tiedje J M, Cole J R. Ecological patterns of *nifH* genes in four terrestrial climatic zones explored with targeted metagenomics using FrameBot, a new informatics tool. *mBio*, 2013, 4(5): e00592-13.
- [16] 张秋芳, 谢锦升, 陈奶寿, 陈坦吕, 茂奎, 张浩, 杨玉盛. 生态恢复对马尾松叶片化学计量及氮磷转移的影响. *生态学报*, 2017, 37(1): 267-276.
- [17] 陈婷敬, 周运超, 杨乃坤, 李华林. 不同岩性土壤上马尾松优良种源育苗研究. *浙江林业科技*, 2014, 34(6): 59-64.
- [18] 赵汝东, 樊剑波, 何园球, 宋春丽, 屠人凤, 谭炳昌. 不同母岩区马尾松人工林土壤酶活性及微生物学性质研究. *生态环境学报*, 2011, 20(2): 253-258.
- [19] 余星, 周运超, 陈婷敬, 李华林, 丁光玲, 雍俊. 马尾松古蓬种源育苗过程对不同岩石发育土壤理化性质的响应. *中南林业科技大学学报*, 2016, 36(6): 34-39.
- [20] 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: 146-191.
- [21] 吴金水, 林启美, 黄巧云, 肖和艾. 土壤微生物生物量测定方法及其应用. 北京: 气象出版社, 2006: 54-73.
- [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] Poly F, Ranjard L, Nazaret S, Gourbière F, Monrozier L J. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5): 2255-2262.
- [24] Yarwood S, Wick A, Williams M, Daniels W L. Parent material and vegetation influence soil microbial community structure following 30-years of rock weathering and pedogenesis. *Microbial Ecology*, 2015, 69(2): 383-394.
- [25] 闫小莉, 王德炉. 不同类型土壤栽培对苦丁茶树叶片生长和光合特性的影响. *生态学报*, 2019, 39(19): 7208-7217.
- [26] Levy-Booth D J, Winder R S. Quantification of nitrogen reductase and nitrite reductase genes in soil of thinned and clear-cut Douglas-fir stands by using real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(21): 7116-7125.
- [27] Coelho M R R, Marriel I E, Jenkins S N, Lanyon C V, Seldin L, O'Donnell A G. 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.
- [28] Juraeva D, George E, Davranov K, Ruppel S. Detection and quantification of the *nifH* gene in shoot and root of cucumber plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 2006, 52(8): 731-739.
- [29] 杨亚东, 冯晓敏, 胡跃高, 任长忠, 曾昭海. 豆科作物间作燕麦对土壤固氮微生物丰度和群落结构的影响. *应用生态学报*, 2017, 28(3): 957-965.
- [30] Herbert R A. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, 23(5): 563-590.
- [31] Nelson D R, Mele P M. The impact of crop residue amendments and lime on microbial community structure and nitrogen-fixing bacteria in the wheat rhizosphere. *Australian Journal of Soil Research*, 2006, 44(4): 319-329.
- [32] Huang W J, Liu J X, Han T F, Zhang D Q, Huang S J, Zhou G Y. Different plant covers change soil respiration and its sources in subtropics. *Biology and Fertility of Soils*, 2017, 53(4): 469-478.
- [33] Silva M C P E, Schlöter-Hai B, Schlöter M, van Elsas J D, Salles J F. Temporal dynamics of abundance and composition of nitrogen-fixing communities across agricultural soils. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74500.
- [34] 乔沙沙, 周永娜, 刘晋仙, 景炬辉, 贾彤, 李磊, 杨欣, 柴宝峰. 关帝山针叶林土壤细菌群落结构特征. *林业科学*, 2017, 53(2): 89-99.
- [35] Yang Y, Wang N, Guo X Y, Zhang Y, Ye B P. Comparative analysis of bacterial community structure in the rhizosphere of maize by high-throughput pyrosequencing. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0178425.
- [36] 周燕, 刘彩霞, 徐秋芳, 梁辰飞, 陈俊辉, 秦华, 李永春. 毛竹入侵森林对固氮微生物群落结构和丰度的影响. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24(4): 1047-1057.
- [37] 葛晓改, 肖文发, 曾立雄, 黄志霖, 付甜, 封晓辉. 不同林龄马尾松凋落物基质质量与土壤养分的关系. *生态学报*, 2012, 32(3): 852-862.
- [38] 刘株秀, 刘俊杰, 徐艳霞, 张武, 米刚, 姚钦, 王光华. 不同大豆连作年限对黑土细菌群落结构的影响. *生态学报*, 2019, 39(12): 4337-4346.
- [39] Sarathchandra S U, Ghani A, Yeates G W, Burch G, Cox N R. Effect of nitrogen and phosphate fertilisers on microbial and nematode diversity in

- pasture soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(7/8): 953-964.
- [40] 何冬华, 沈秋兰, 徐秋芳, 陈俊辉, 程敏, 毛新伟, 李永春. 不同年限毛竹林土壤固氮菌群落结构和丰度的演变. *土壤学报*, 2015, 52(4): 934-942.
- [41] 冯晓敏, 杨永, 任长忠, 胡跃高, 曾昭海. 燕麦/大豆和燕麦/花生间作对根际土壤固氮细菌多样性与群落结构的影响. *中国农业大学学报*, 2016, 21(1): 22-32.
- [42] Ligi T, Oopkaup K, Truu M, Preem J K, Nölvak H, Mitsch W J, Mander Ü, Truu J. Characterization of bacterial communities in soil and sediment of a created riverine wetland complex using high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing. *Ecological Engineering*, 2014, 72: 56-66.
- [43] Fazi S, Amalfitano S, Pernthaler J, Puodu A. Bacterial communities associated with benthic organic matter in headwater stream microhabitats. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(10): 1633-1640.
- [44] Anderson D W. The effect of parent material and soil development on nutrient cycling in temperate ecosystems. *Biogeochemistry*, 1988, 5(1): 71-97.
- [45] Cavacini P. Soil algae from northern Victoria Land (Antarctica). *Polar Bioscience*, 2001, 14: 45-60.
- [46] Zehr J P, Jenkins B D, Short S M, Steward G F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(7): 539-554.
- [47] Hadas O, Pinkas R, Malinsky-Rushansky N, Nishri A, Kaplan A, Rimmer A, Sukenik A. Appearance and establishment of diazotrophic cyanobacteria in Lake Kinneret, Israel. *Freshwater Biology*, 2012, 57(6): 1214-1227.
- [48] Beversdorf L J, Miller T R, McMahon K D. The role of nitrogen fixation in cyanobacterial bloom toxicity in a temperate, Eutrophic Lake. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56103.
- [49] Ferber L R, Levine S N, Lini A, Livingston G P. Do cyanobacteria dominate in eutrophic lakes because they fix atmospheric nitrogen? *Freshwater Biology*, 2004, 49(6): 690-708.
- [50] Sangwan P, Chen X L, Hugenholtz P, Janssen P H. *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov., the first pure-culture representative of subdivision two, *Spartobacteria* classis nov., of the phylum *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(10): 5875-5881.
- [51] 倪惠菁, 苏文会, 范少辉, 曾宪礼, 金艺. 养分输入方式对森林生态系统土壤养分循环的影响研究进展. *生态学杂志*, 2019, 38(3): 863-872.
- [52] Orr C H, James A, Leifert C, Cooper J M, Cummings S P. 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.