

DOI: 10.5846/stxb202004010772

曹升, 潘菲, 林根根, 张燕林, 周垂帆, 刘博. 不同林龄杉木林土壤细菌群落结构与土壤酶活性变化研究. 生态学报, 2021, 41(5): 1846-1856.

Cao S, Pan F, Lin G G, Zhang Y L, Zhou C F, Liu B. Changes of soil bacterial structure and soil enzyme activity in Chinese fir forest of different ages. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(5): 1846-1856.

不同林龄杉木林土壤细菌群落结构与土壤酶活性变化研究

曹 升^{1,2}, 潘 菲^{1,2}, 林根根³, 张燕林^{1,2}, 周垂帆^{1,2,3,*}, 刘 博^{1,2}

1 福建农林大学林学院, 福州 350002

2 人工林可持续经营福建省高校工程研究中心, 福州 350002

3 福建省长汀县水土保持站, 龙岩 366300

摘要:探究不同林龄杉木人工纯林土壤中的微生物的群落演变与结构特征与酶活性变化,为杉木人工林可持续经营管理提供依据。以福建省南平市的五片不同林龄杉木林表层土壤作为研究对象,通过 16S rDNA 测定细菌的群落组成,分析与土壤质量密切相关的四种土壤酶活性变化,揭示细菌群落与土壤酶活性的变化机理。结果表明,微生物的多样性指数与 OTU 都随着林龄的增加而增加,且幼龄林、中龄林、近熟林、成熟林土壤微生物结构差异较大;不同林龄杉木人工林中包含了 29 个细菌门,其中酸杆菌门与变形菌门为优势菌群,根据各种群相对丰度变化以及冗余分析,放线菌门、浮霉菌门与疣微菌门等均随林龄增长出现较大变化,且与土壤可溶性有机质以及速效养分有显著相关性($P < 0.05$),说明这几种细菌群落对土壤养分变化较敏感;土壤养分变化会影响土壤酶活性,蔗糖酶与全碳呈显著正相关($P < 0.05$),与速效钾呈显著负相关($P < 0.05$),与放线菌门呈极显著负相关($P < 0.01$)。脲酶与速效氮呈显著负相关($P < 0.05$),脲酶与变形菌门、绿弯菌门、放线菌门、硝化螺旋菌门以及拟杆菌门均存在较强相关性。综上,不同的土壤细菌种群与酶活性对各养分变化的响应程度不一,细菌群落结构与酶活性能反映不同林龄杉木林土壤的质量变化,适量延长杉木人工林种植年限有益于土壤质量恢复。本研究结果对指导杉木人工林优质经营有重要意义。

关键词:杉木人工林;土壤;细菌群落;酶活性;土壤养分

Changes of soil bacterial structure and soil enzyme activity in Chinese fir forest of different ages

CAO Sheng^{1,2}, PAN Fei^{1,2}, LIN Gengen³, ZHANG Yanlin^{1,2}, ZHOU Chuifan^{1,2,3,*}, LIU Bo^{1,2}

1 College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

2 Fujian Provincial Colleges and University Engineering Research Center of Plantation Sustainable Management, Fuzhou 350002, China

3 Soil and Water Conservation Station in Changting, Fujian, Longyan 366300, China

Abstract: In order to understand the changes in the soils of Chinese fir plantations at different ages, this article explores the response mechanism of soil microorganisms and enzyme activity to forest age growth, providing a basis for sustainable management of Chinese fir plantations. Five Chinese fir forests of different ages were targeted in Nanping. 16s rDNA was used to study the composition of the bacterial community, and four enzyme activity changes closely related to soil quality were analyzed. The results showed that both the microbial diversity index and OTU (Operational Taxonomic Units) increased with the increase of forest age. The soil microbial structure of young forests, middle-aged forests, near-maturity forests, and mature forests had large differences. There were 29 bacterial phylums in different ages of Chinese fir

基金项目:国家自然科学基金项目(32071746);福建自然科学基金项目(2020J01520);福建林业局科技推广项目(2020TG20);福建农林大学林学高峰学科建设优秀青年培育工程(71201800727)

收稿日期:2020-04-01; 修订日期:2020-08-13

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhouchuifan@163.com

plantations. Acidobacteria and Proteobacteria were the dominant species. According to the changes of various groups and redundant analysis, Actinomycota, Verrucomicrobia, and Planctomycetes all changed significantly with age, and they were significantly related to soil dissolved organic matter and available nutrients ($P < 0.05$). It shows that these bacterial communities are more sensitive to changes in soil quality. Soil nutrient changes affected soil enzyme activity. Sucrase had a significant positive correlation with total carbon ($P < 0.05$) and negative correlation with available potassium ($P < 0.05$), and a very significant negative correlation with actinomycetes ($P < 0.01$). There was a strong correlation between urease and available nitrogen ($P < 0.05$). Urease was strongly correlated with Proteobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria, Nitrospirae, Bacteroidetes. In summary, soil nutrient changes have different effects on soil bacterial populations and enzyme activities. Bacterial community structure and enzyme activity can reflect changes in soil quality of Chinese fir forest at different ages. Extending the planting period of Chinese fir plantation is beneficial to the restoration of soil quality. The results of this study are of great significance for guiding the management of Chinese fir plantations.

Key Words: Chinese fir plantation; soil; bacterial community; soil enzyme; soil nutrients

杉木作为速生树种,种植历史悠久,且在我国南方大量分布。杉木的凋落物少、养分回归土地周期长以及大面积杉木纯林的持续种植,使土壤养分与天然混交林土壤养分变化规律有较大差异。杉木人工林种植周期的确定往往基于经济效益与碳汇收益^[1],而种植周期长短对土壤质量的影响常被忽略。土壤肥力与杉木人工林的生长及其可持续发展密切相关,因此在确定杉木人工林种植周期时,还需考虑土壤质量随林龄变化的规律。此外,目前有关杉木人工林的研究多聚焦于杉木幼龄林和中龄林,缺乏对成熟林和过熟林土壤的研究^[2-3],这极大限制了我们对杉木林土壤质量随种植年限变化的认知。

土壤生物学指标(如土壤细菌与土壤酶)与土壤性质密切相关,均对土壤质量变化十分敏感^[4-5]。研究表明,细菌群落结构受到土壤植被、理化性质、有机质含量等的影响,能在土壤环境改变时快速做出反应^[6]。因此,通过对不同发育阶段杉木林土壤中细菌群落结构进行测定,能够及时有效的监测土壤微生物群落及功能变化,这对揭示人工林经营引起土壤质量演变的微生物学机理具有重要意义。国内目前已有较多学者对杉木林土壤微生物结构进行过分析,研究发现,3a、12a 与 38a 的杉木林土壤中,微生物代谢活性与多样性指数逐渐增加,这与土壤 pH 值、碳氮比和全氮的含量变化有关^[7]。魏志超对幼、中、老年的杉木林土壤做了微生物多样性分析,发现幼年林的多样性最高,但均匀度不够,推测是由于幼年林样地环境复杂植被数目覆盖度低导致^[8]。也有学者对 1、4、10、18、32a 的杉木林土壤进行微生物数量的研究后发现,土壤中微生物数量随着林龄的增加呈现先上升后下降趋势^[9]。目前土壤细菌对杉木林龄变化的响应机制并未明确,得出的细菌群落变化规律不一,因此亟需进一步分析杉木林龄对土壤细菌活性影响,揭示不同林龄杉木林土壤细菌群落特征。

土壤酶作为一种活性物质,对土壤物化性质的改变极其敏感^[10]。前人研究表明,人工林随着种植年限的增加,其土壤酶活性会产生显著变化^[11]。土壤脲酶、酸性磷酸酶、 β -N-乙酰基葡萄糖苷酶、蔗糖酶均与人工林土壤质量密切相关,其活性能迅速对土壤养分变化产生响应,常被作为评价土壤质量的重要指标^[12]。由于酶活性与土壤中生化反应息息相关,因此其活性与土壤细菌活性关系密切^[13]。目前对于森林土壤中酶活性研究,多集中于与土壤养分、林下植被的关系。对于不同林龄杉木林的土壤细菌群落与酶之间的关系研究鲜有报道,本文对土壤养分、细菌群落以及酶活性的研究,有利于进一步了解不同酶活性在不同林龄杉木林中的变化特征,为杉木人工林合理种植提供依据。

鉴于此,本实验通过采集不同林龄杉木人工林土壤样品,对不同林龄杉木林的土壤养分进行测定,利用高通量测序中 16SrDNA 区对细菌的 DNA 进行物种注释,挖掘出不同的样本中细菌物种的差异性。同时,本实验挑选出与酸性土壤及土壤细菌活性密切相关的四种酶进行测定。进而探讨不同林龄杉木人工林土壤养分与土壤细菌群落、土壤酶活性之间的关系,揭示土壤微生物与土壤酶对杉木林龄变化的响应规律,为有效评价监测杉木林土壤质量提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况与样品采集

福建省南平市是我国杉木的中心产区之一。南平市杉木种植历史悠久,分布着大量的杉木人工林。该地为亚热带季风气候,气候温暖潮湿,年平均温度 19.3°C ,相对湿度为 83%,年平均降水量为 1699mm,主要集中在 3 月份到 8 月份^[14]。土壤为由花岗岩为母质发育而成的红壤。土壤样品采集于南平市溪后村($26^{\circ}39'\text{N}$, $117^{\circ}55'\text{E}$),在该地选择立地条件相似,林龄不一的五片杉木人工林,分别为 4 年林(4a),15 年林(15a),24 年林(24a),43 年林(43a)与 100 年林(100a),样地位置见图 1。其中 4a 为幼龄林,15a 为中龄林,24a 为近熟龄,43a 与 100a 为过熟林。采样时间为 2018 年 7 月 27、28 日,样品采集时均为晴天。每片林地选择三个相似的土坡,土坡的坡度为 30° — 40° ,坡向均为东南向。乔木层主要以杉木为主,4a 土地植被覆盖度较低,林下植被主要以芒萁为主,另有薄盖短肠蕨、五节芒等少量草本植物分布,15a 与 24a 植被丰富度上升,灌木层植物主要有山苍子、毛冬青、盐肤木、木荷、虎皮楠等,草本层植物主要有芒萁、狗脊、乌毛蕨、扇叶铁线蕨、黑莎草、五节芒等。过熟林(43a 与 100a)灌木层植物数量更为丰富,主要有粗叶榕、青冈、毛冬青、苦槠、盐肤木、细圆藤等,草本层主要有观音座莲蕨、淡绿短肠蕨、狗脊、华山姜、黑莎草等。每个土坡上划定 $20\text{m}\times 20\text{m}$ 的采样地,沿着 S 形选择六个采样点,在去除表层枯枝落叶层后,用土钻采集 0—20cm 的表层土壤,并将六个采集点的土样等量混合为一份样品。每片人工林采集三个样品。每份土壤样品过 20 目筛后放入 4°C 的冰箱中冷藏保存,一部分用于土壤细菌检测,一部分用于测定土壤酶与进行理化性质分析。其中土壤理化性质测定结果如表 1。

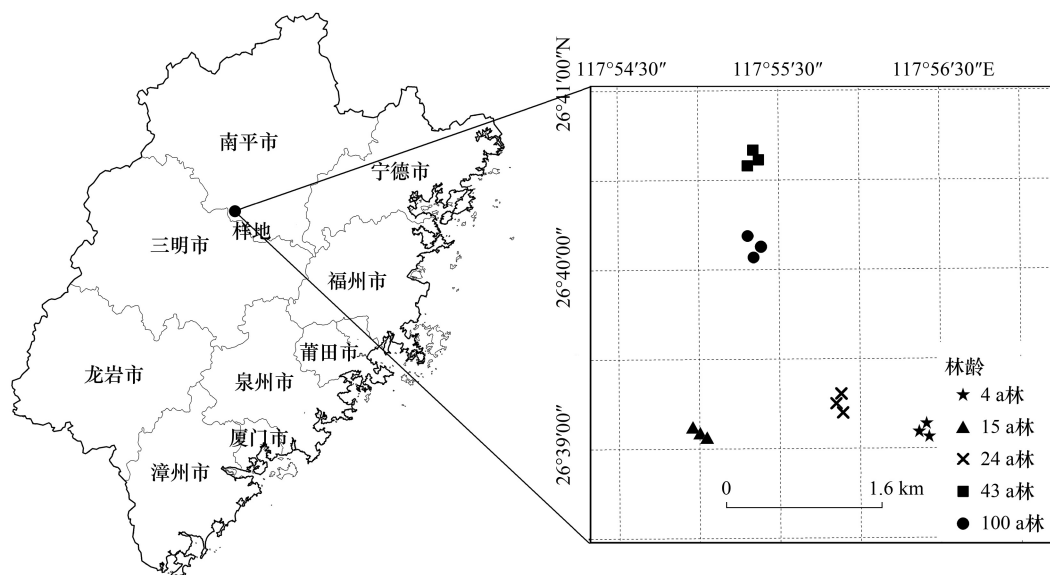


图 1 研究区域位置图

Fig. 1 Location map of study area

1.2 土壤细菌测定

从样品中提取细菌的 DNA,通过引物 338F ($5'-\text{ACTCCTACGGGAGGCAGCA}-3'$)与 806 ($5'-\text{GGACTACHVGGGTWTCTAAT}-3'$)与衔接子序列和条形码序列组合来扩增细菌 16S rRNA 的 V3 和 V4 区域。PCR 反应体系包括 60ng 的基因组 DNA、 $10\mu\text{L}$ Buffer、 $0.2\mu\text{L}$ Q5 高保真 DNA 聚合酶、 $10\mu\text{L}$ 高 GC 增强剂、 $1\mu\text{L}$ dNTP、 $10\mu\text{M}$ 每种引物,最后用灭菌超纯水补充总体系到 $50\mu\text{L}$ 。PCR 的反应条件为: 95°C 5min, 95°C 1min, 50°C 1min, 72°C 1min 15 个循环,最后在 72°C 反应 7min,最后置于 4°C 的环境中。扩增后的 PCR 产物进行第二

轮纯化处理,其包含 20 μ L $\times$ PhusionHF MM,8mL 灭菌超纯水,10 μ M 每种引物和上一步的 10 μ LPCR 产物。热循环条件如下:98 $^{\circ}$ C 30s,98 $^{\circ}$ C 10s,65 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,最终在 72 $^{\circ}$ C 下反应 5min,然后使用 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳 40min。最后,对纯化后的产物进行 Nanodorp 2000 定量,将产物按照 1:1 进行混样,最后切胶回收。在北京百迈克生物科技有限公司进行高通量测序分析。

表 1 不同林龄杉木林土壤主要理化性质

Table 1 Soil physicochemical properties of Chinese fir forests with different ages

	林龄 Stand age				
	4a	15a	24a	43a	100a
pH	4.50 $\pm$ 0.06 ab	4.67 $\pm$ 0.02 b	4.42 $\pm$ 0.06 a	5.12 $\pm$ 0.05 c	4.60 $\pm$ 0.01b
全氮 Total N/(g/kg)	1.27 $\pm$ 0.19 a	1.35 $\pm$ 0.22 a	1.57 $\pm$ 0.11 a	1.28 $\pm$ 0.06 a	1.60 $\pm$ 0.06 a
全钾 Total K/(g/kg)	16.01 $\pm$ 7 a	25.83 $\pm$ 2.1 a	54.52 $\pm$ 7.2 b	63.39 $\pm$ 6.2 b	62.13 $\pm$ 8.1 b
全磷 Total P/(mg/kg)	60.41 $\pm$ 7.81 a	71.27 $\pm$ 1.19 a	95.90 $\pm$ 10.31 a	64.86 $\pm$ 7 a	88.33 $\pm$ 7 a
全碳 Total C/(g/kg)	25.25 $\pm$ 3.47 a	26.37 $\pm$ 2.58 a	22.19 $\pm$ 1.37 a	16.83 $\pm$ 0.8 a	21.30 $\pm$ 1.08 a
有效磷 Available P/(mg/kg)	6.79 $\pm$ 0.15 b	8.05 $\pm$ 0.14 a	6.85 $\pm$ 0.15 b	6.33 $\pm$ 0.36 b	6.69 $\pm$ 0.44 b
速效钾 Available K/(mg/kg)	28.21 $\pm$ 0.74 a	29.85 $\pm$ 0.74 a	28.50 $\pm$ 0.63 a	34.50 $\pm$ 1.21 b	31.21 $\pm$ 0.58 a
可溶性有机碳 DOC/(mg/kg)	104.70 $\pm$ 2.57 b	98.30 $\pm$ 3.99 b	90.46 $\pm$ 5.10 a	65.57 $\pm$ 4.40 a	75.59 $\pm$ 3.36 a
铵态氮 NH ₄ ⁺ /(mg/kg)	11.05 $\pm$ 3.92 a	11.00 $\pm$ 1.0 a	9.66 $\pm$ 0.80 a	8.64 $\pm$ 0.19 a	8.39 $\pm$ 0.82 a
硝态氮 NO ₃ ⁻ /(mg/kg)	1.46 $\pm$ 0.26 a	2.05 $\pm$ 0.99 a	2.56 $\pm$ 0.39 a	3.14 $\pm$ 0.63 a	7.02 $\pm$ 1.78 b

1.3 土壤酶测定

土壤酸性磷酸酶活性的测定原理为测定酸性环境下,其催化磷酸苯二钠水解生成的苯酚的生成量。将 37 $^{\circ}$ C 中每克土每天释放的 1 μ mol 酚定义为一个酶活性单位来表示其活性^[15]。

土壤脲酶活性的测定是利用靛酚蓝比色法,测定出脲酶在水解尿素的过程中产生的 NH₃-N 含量。每克土每天产生的 1 μ g NH₃-N 定义为一个酶活力单位。

土壤 β -基葡萄糖苷酶的测定原理是为该酶能分解 β -N-乙酰基葡萄糖苷生成对-硝基苯酚,生成物在 400nm 有最大吸收值,并通过酶标仪来测定吸光值升高速率来计算该酶的活性。将每克土每天产生的 1 μ mol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

土壤蔗糖酶活性测定原理为该酶能催化蔗糖降解产生果糖与葡萄糖并与 3,5-二硝基水杨酸反应,根据生成的红棕色氨基化合物在 510nm 光的吸收增加速率来计算该酶的活性。将每天每克土产生的 1mg 还原糖定义为一个酶活力单位^[16]。

以上酶测定均使用酶标仪(SpectraMax M4,美国)测出。

1.4 数据分析

细菌数据分析是基于 Illumina HiSeq 测序平台,将测序得到的双端 reads 数 PE Reads 利用 FLASH v1.2.7 软件进行拼接得到 Raw Tags,使用软件 Trimmomatic v0.33 对 Raw Tags 过滤后得到 Clean Tags,再使用 UCHIME v4.2 软件对其进行过滤嵌合体最后得到有效 Tags 数据。这种通过对 Reads 过滤与双端拼接并去除嵌合体方法处理后,能得到高精度的微生物种群数据^[17]。将优化后的数据进行 OTUS (Operational Taxonomic Units) 聚类,使用 QIIME (version 1.8.0) 软件^[18]进行物种注释以及丰度分析、系统分类、主成分分析等。

使用 EXCLE2010、SPSS20.0 进行了数据处理与分析,其中在 SPSS 中使用单因素方差分析、LSD 多重比较进行了数据对比分析,样品均值比较的最小显著差异检验的显著性水平为 0.05。使用 Origin 2018 等软件分析绘制出实验数据图表。使用 Canoco 4.5 对土壤养分、土壤微生物与酶之间的关系进行冗余分析。

2 结果分析

2.1 土壤细菌测序统计

各阶段的序列数、有效率以及覆盖率可反映数据质量。不同林龄土壤细菌样本测定的原始序列数(Raw tags)均在 60000 条以上,有效序列数(Clean tags)均在 50000 条以上,有效率均达到 86% 以上,覆盖率均高于 99% (表 2),说明样本中细菌测出率较高,结果足以反映样本的真实情况。

表 2 细菌测序处理结果统计
Table 2 Sequencing statistics of bacteria

林龄/a Stand age	原始序列数 Raw tags	有效序列数 Clean tags	有效率 Effective/%	覆盖率 Coverage
4	65487	60926	86.63	0.998
15	62397	58272	87.97	0.998
25	77701	72522	86.77	0.998
43	67830	63164	86.76	0.997
100	74413	69245	86.39	0.998

2.2 细菌群落 OTU 数目与多样性分析

对样品 Tags 中相似度高于 97% 的序列进行划分定义为一个 OTU(Operational Taxonomic Units),OTU 个数能直观反应出不同样品中细菌种群丰富程度。Alpha 多样性(Alpha diversity)能同时反应单个样品物种丰度与物种多样性。其中包含的 Chao1 能反映物种丰度,香农(Shannon)指数能反映物种的多样性。Shannon 指数越小说明群落多样性越低。表 3 中细菌 OUT 数量随着林龄依次增加,表明随着林龄增长,杉木林土壤中细菌种群丰度上升。从表格中 Chao1 值可看出,细菌的丰度随着林龄的增加而增加。从 Shannon 指数可以看出细菌多样性 15a 近熟林期间要高于幼年林 4a 与成熟林 24a,过熟林 43a 与 100a 细菌的多样性无显著差异。

表 3 不同林龄杉木林细菌 Alpha 多样性分析
Table 3 Soil physicochemical properties of Chinese fir forests with different ages

林龄/a Stand age	分类单元 OTUs	Chao1 指数 Chao1 index	香农指数 Shannon index
4	909±35 a	999.588±64.04 a	5.533±0.116 a
15	982±12 ab	1034.092±6.57 a	5.706±0.45 a
24	1007±25 b	1038.364±24.47 a	5.555±0.044 a
43	1014±29 b	1058.105±16.70 a	5.770±0.052 a
100	1056±10 b	1102.768±5.20 a	5.751±0.067 a

图 2 为等级丰度曲线,基于五个样品的相对丰度绘制而成,曲线在横轴宽窄能表示物种组成的丰富程度,曲线的平缓程度能表明物种的均匀程度。图 2 中曲线显示样品曲线随着林龄增加而放缓,说明随着杉木林龄的增长,细菌种群均匀度增加。

2.3 土壤细菌结构分析

主成分分析(Principal Component Analysis,PCA)可以将多组数据的差异反映在二维坐标图中。图中点距离的远近可表示样品组间组成成分的相似度。图 3 中可 15a 与 43a 大部分位于第一象限,100a、24a、4a 分布在第二、三、四象限,各样品间细菌群落多样性均有较大差异。幼年期杉木林由于林下植被稀疏,4a 样品属于林下植被较为稀疏的幼年期杉木林土壤,其微生物群落不仅分布均匀度较低,群落结构也有较大差异性。24a 土壤细菌与其余样品差异较大。15a 与 43a 细菌群落结构相似性较高,43a 与 100a 的细菌群落结构也具有一定相似性。不同林龄的样品在图中分布位置相对独立,说明不同林龄土壤细菌群落结构有比较显著的差异。

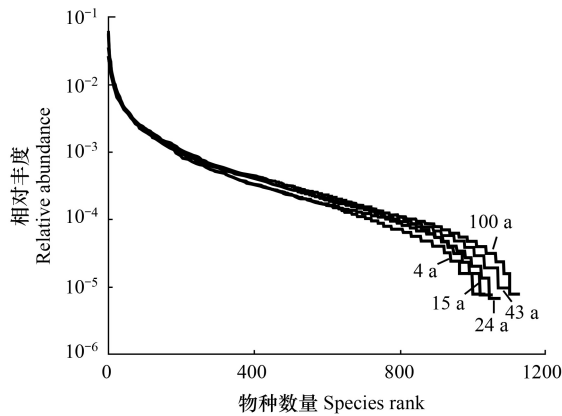


图2 不同林龄土壤细菌等级丰度曲线

Fig.2 Bacterial grade abundance curve of different forest ages

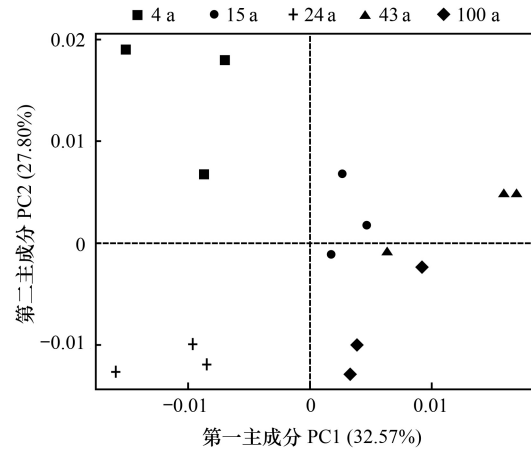


图3 不同林龄土壤细菌 PCA 图

Fig.3 Bacterial PCA map of soil in different ages

2.4 细菌群落组成与结构分析

不同林龄土壤样本中共检测出 25 个菌门,选取土壤细菌优势种的分类单元,构建土壤细菌系统分类树(图 4)。可以从图中看出微生物的进化关系,饼图的半径越大,该物种的丰度越高。不同颜色代表不同样品,不同样品在饼图中所占面积越大,说明该物种丰度在样品中相对其他样品含量更高。从饼图中可看出,大部分物种较均匀,小部分物种属于稀有门类,仅在部分样本中发现。如图所示,酸杆菌门(*Acidobacteria*)和变形菌门(*Proteobacteria*),是土壤中的优势菌种。放线菌门(*Actinobacteria*)随着林龄的增加相对丰度呈现下降趋势。黄杆菌属(*Flavobacterium*)绝大部分分布于 43a 与 100a 中,芽孢杆菌属(*Bacillus*)在 15a 中含量最多,100a 中分布最少,亚硝化单胞菌(*Nitrosomonadaceae*)在 100a 中含量最高。黄单胞菌科(*Xanthomonadaceae*)在 24a 中含量最高。

2.5 土壤酶含量分析

对不同林龄杉木林土壤的酶活性进行分析(表 4),脲酶在 4a 中含量最低,为 363.29 $\mu\text{mol/g}$,到 15a 时上升到 529 $\mu\text{mol/g}$,在 24a 时下降到 455.92 $\mu\text{mol/g}$,43a 与 100a 时分别为 480.85 $\mu\text{mol/g}$ 与 545.14 $\mu\text{mol/g}$,均与 4a 呈现显著差异($P<0.05$)。蔗糖酶在 24a 比 15a 少量增加,但整体呈现下降趋势。 β -N-乙酰基葡萄糖苷酶的波动较大,与酸性磷酸酶呈现趋势大致相同。

表 4 不同林龄杉木林土壤酶活性

Table 4 Enzyme activities in soil ages of Chinese fir plantations in different age

林龄/a Stand age	脲酶 Urase/ ($\mu\text{g d}^{-1} \text{g}^{-1}$)	蔗糖酶 Sucrase/ ($\text{mg d}^{-1} \text{g}^{-1}$)	β -N-乙酰葡萄糖苷酶 β -N-acetylglucosaminidase/ ($\mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$)	酸性磷酸酶 Acid phosphatase/ ($\mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$)
4	363.29 $\pm$ 0.00a	59.31 $\pm$ 11.03a	22.56 $\pm$ 8.54a	14.62 $\pm$ 1.39a
15	528.00 $\pm$ 0.03b	52.27 $\pm$ 1.36a	17.45 $\pm$ 0.08a	14.54 $\pm$ 1.14a
24	455.92 $\pm$ 0.00b	54.05 $\pm$ 4.65a	24.40 $\pm$ 4.26a	15.80 $\pm$ 0.92a
43	480.85 $\pm$ 0.02b	48.58 $\pm$ 0.84a	13.19 $\pm$ 4.85a	12.59 $\pm$ 0.82a
100	545.14 $\pm$ 0.02b	44.55 $\pm$ 2.77a	25.79 $\pm$ 8.79a	13.72 $\pm$ 0.47a

2.6 土壤养分、土壤细菌与酶活性之间的冗余分析与相关性分析。

通过冗余分析做出的 RDA 图,图中的因子所对应的射线越长,其对研究对象的影响程度越大;根据研究对象所对应的线段之间的垂直距离的长短,可判断两者的相关性,垂直距离越短则相关性越大。图 5a 的 RDA1 轴与 RDA2 轴可以分别解释细菌群落在养分影响下的 65.1% 与 22.9%,pH、AK、DOC、TK、TN、 NO_3^- 、

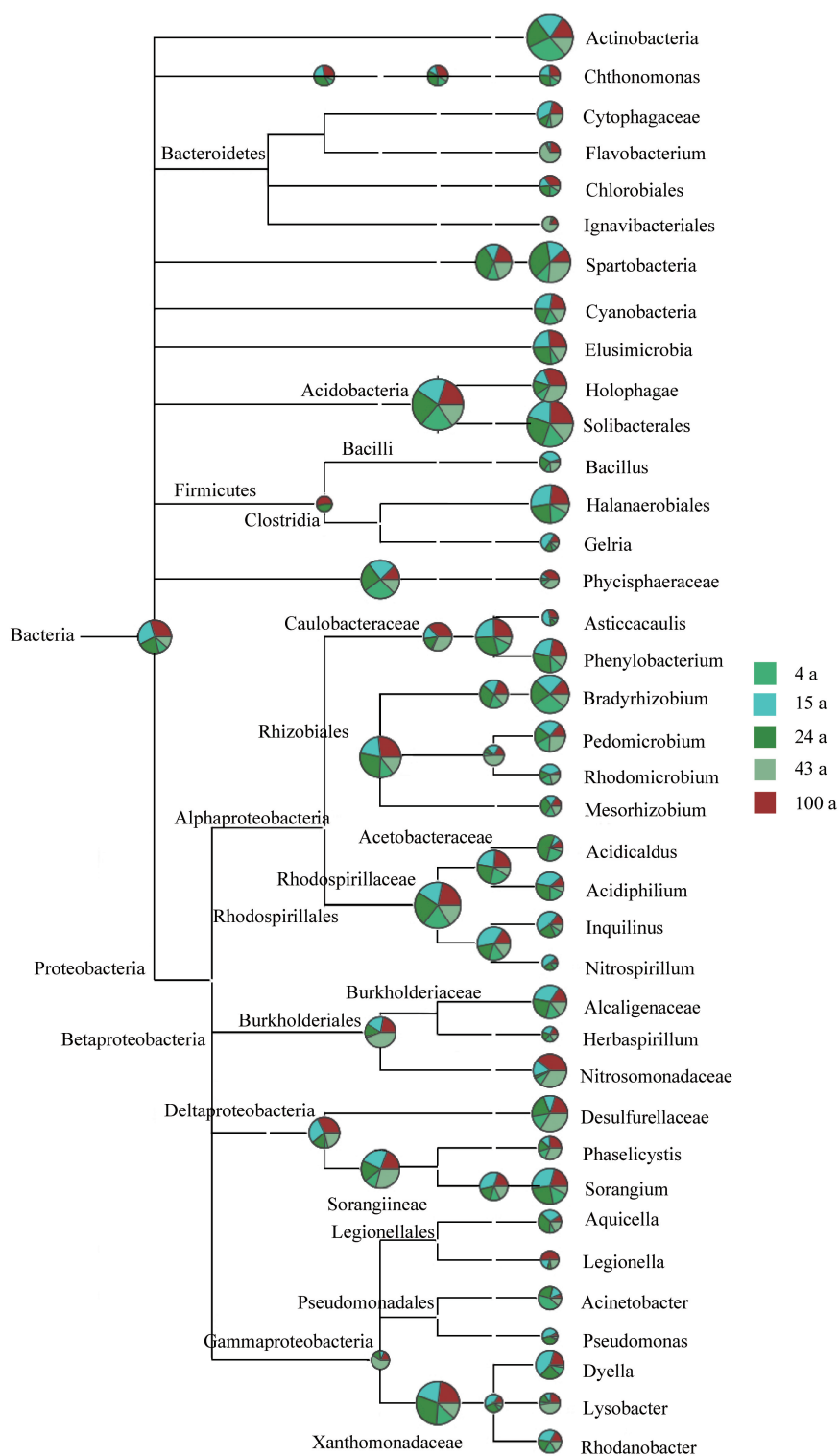


图4 不同林龄土壤细菌系统分类树

Fig. 4 Soil bacterial taxonomy tree of Chinese fir forests with different ages

NH_4^+ 均对土壤细菌群落变化有重要影响。结合冗余分析与 Person 相关性分析, 浮霉菌门与 NH_4^+ 呈现极显著正相关($r=0.622^{**}$, $P<0.01$), 与 DOC 呈现极显著正相关($r=0.702^{**}$, $P<0.01$), 与 C 呈现极显著正相关($r=0.653^{**}$, $P<0.01$)。绿弯菌门与 TK、TN 呈现显著负相关($r=-0.545^*$, $r=-0.569^*$, $P<0.05$), 放线菌

门与 DOC 呈现显著正相关($r=0.602^*$, $P<0.05$),与 TK 呈现极显著负相关($r=-0.749^{**}$, $P<0.01$)。硝化螺旋菌门与 pH、AK 呈现极显著正相关($r=0.805^{**}$, $r=0.835^{**}$, $P<0.01$),与 DOC 呈现极显著负相关($r=-0.792^{**}$, $P<0.01$),与 TC 呈现显著负相关($r=-0.635^*$, $P<0.05$)。

b 图的 RDA1 轴能表达土壤酶在土壤养分变化影响下变化的 99.3%,c 图的 RDA1 轴与 RAD2 轴能解释细菌群落在酶影响下变异程度的 65.1%与 22.9%。结合冗余分析与 pearson 相关性分析,酸性磷酸酶(S-ACP)与土壤 pH 值呈现显著负相关($r=0.565^*$, $P<0.05$)。蔗糖酶与土壤 TC 呈现显著正相关($r=0.546^*$, $P<0.05$),与 TK 呈现显著负相关($r=-0.538^*$, $P<0.05$)。酸性磷酸酶与 DOC 呈现显著正相关($r=0.565^*$, $P<0.05$),与 AK 呈现显著负相关($r=-0.598^*$, $P<0.05$)。根据 RDA 图中各箭头夹角能看出,脲酶与 NH_4^+ 呈现显著负相关($r=-0.621^*$, $P<0.05$),与变形菌门呈极显著正相关($r=0.639^*$, $P<0.01$),与拟杆菌呈极显著正相关($r=0.652^*$, $P<0.01$),与绿弯菌呈显著负相关($r=0.636^*$, $P<0.05$),与放线菌呈极显著负相关($r=-0.691^{**}$, $P<0.01$)。酸性磷酸酶与硝化螺旋菌门呈显著负相关($r=-0.588^*$, $P<0.05$)。蔗糖酶与放线菌呈极显著正相关($r=0.660^{**}$, $P<0.01$)。总体来说,土壤养分变化会导致土壤酶活性变化。土壤酶活性变化与变形菌门、绿弯菌门、放线菌门、硝化螺旋菌门、拟杆菌门相关性较强。

3 讨论

3.1 不同林龄杉木林土壤细菌群落组成变化

杉木林土壤微生物与土壤质量关系密切,可以通过微生物的活跃程度及种群数量变化探知林龄对土壤微生物的影响。本研究中不同林龄杉木林,在土壤类型、管理方式基本相似的情况下,细菌群落结构随林龄变化显著。根据等级丰度曲线,土壤中细菌群落的多样性与丰富度均随着林龄的增加规律上升。随着森林发育年份增加,人为干扰降低,林下植被增长以及腐殖质累积有利于微生物种群数量的增长^[19]。类似的一些研究表明,林龄较大、郁闭度较高的人工林土壤微生物多样性较高,研究结果与本研究结果一致^[20-21]。因此若杉木人工林种植时间过短,会对土壤细菌生物量产生显著影响,不利于土壤质量提升。细菌群落数量总体增加,但具体的细菌种群增长下降情况不一,还需对不同林龄中具体细菌群落进行分析。根据高通量测序结果,本研究 4a 中细菌结构与其他林龄细菌结构相比,相似度最低,15a 与 24a、43a 与 100a 相似较高,说明杉木林在发育中的四个阶段(幼年林、中龄林、成熟林、过熟林)过程中细菌结构特点出现变化。前人的研究指出在不同发育阶段杉木对不同养分的消耗利用率不一^[22],导致与土壤养分密切相关的具体细菌群落随养分在杉木不同发育期中发生变化^[23]。

通过对土壤中具体群落组成进行分析,结果表明土壤中酸杆菌门与变形菌门为优势菌门,与大多数对土壤细菌结构研究结果相似,如杨安娜等^[24]对杉木林与马尾松林土壤细菌的检测结果显示酸杆菌门在不同林地的含量达到 32.68%—49.17%,Zhang 等^[25]对四个不同省份土壤细菌进行测定,发现酸杆菌占细菌群落的 28.6%—51.6%。酸杆菌为土壤样品中相对丰度最高菌种,由于样品采集地为典型酸性红壤,且酸杆菌具有嗜酸性,因此在土壤中大量存在。张芸^[26]等人对杉木人工林有机质研究结果表明可溶性有机碳、可溶性有机氮均随着林龄增加呈现下降趋势,这主要是由于杉木纯林在成长内需要消耗大量土壤有机质,且生长期杉木枝叶掉落到被分解归还需要较长的时间周期造成的^[27]。并且由于放线菌在土壤中能起到降解有机质的作用^[28],根据养分与细菌群落的相关性分析,本研究中土壤中放线菌与土壤有机质的含量呈现出正相关的关系,从而造成放线菌随着林龄的增加呈现出下降的趋势,这也与张晓红等^[29]的研究结果一致,因此,可以通过土壤中放线菌的丰度推测土壤中有机质的水平^[30]。此外,TP 与细菌群落变化无显著关系,酸性土壤环境使土壤中 P 生成的难溶性物质难以被细菌利用。根据前人研究,硝化螺旋菌门与土壤硝酸盐的产生有重要影响^[31],但硝化螺旋菌门更适合高 pH 环境,酸性土壤会一定程度抑制硝化螺旋菌门的活性,这与本研究结果一致,实验中硝化螺旋菌门与 pH 呈现极显著正相关,说明土壤酸性越强,硝化螺旋菌门种群相对丰度越低。杉木林对 NH_4^+ 的获取能力远高于 NO_3^- ^[32],本研究中杉木林土壤中 NH_4^+ 出现随林龄下降的趋势。浮霉菌门为典

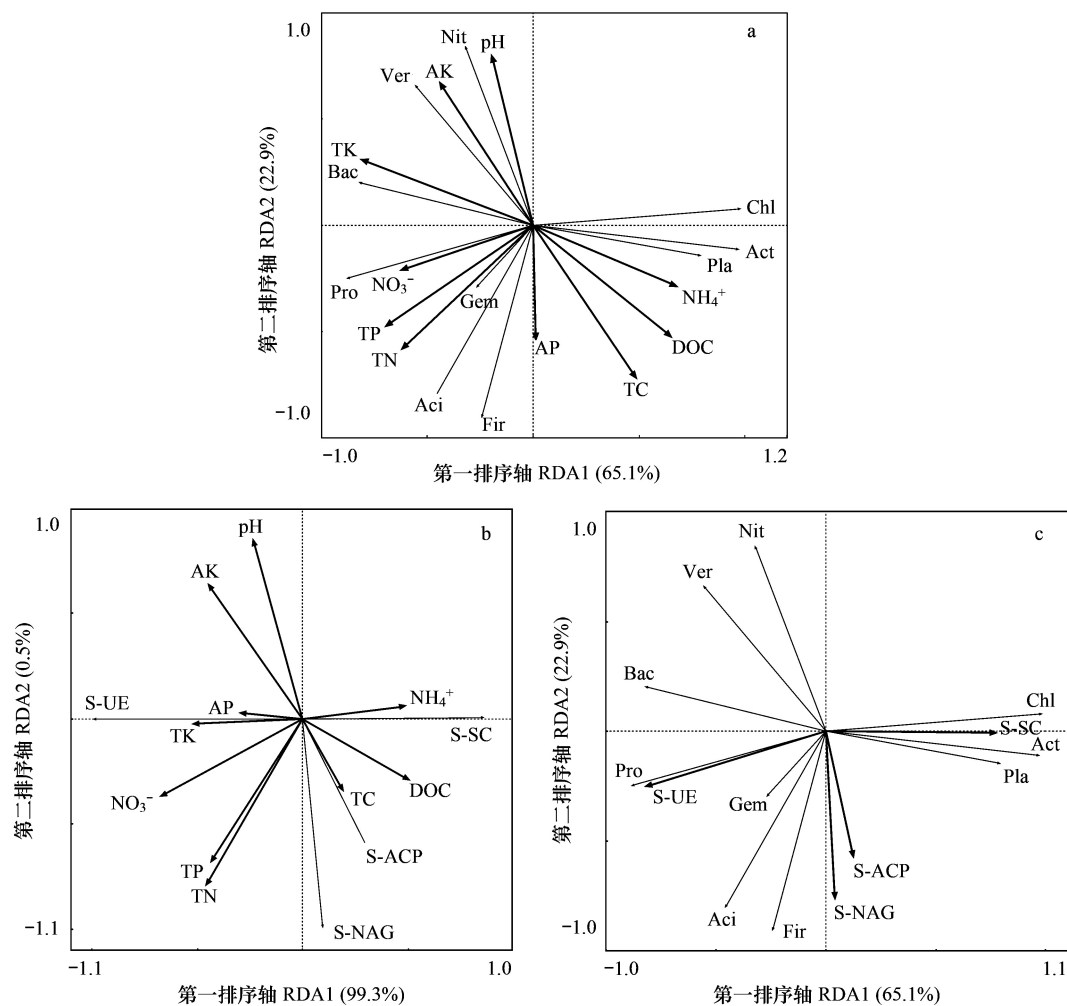


图5 土壤养分、细菌相对丰度与酶活性相关性分析

Fig.5 Correlation analysis between soil nutrient, relative abundance of bacteria and enzyme activity

Aci:酸杆菌门,Pro:变形菌门,Chl:绿弯菌门,Act:放线菌门,Ver:疣微菌门,Fir:厚壁菌门,Pla:浮霉菌门,Gem:芽单胞菌门。Nit:硝化螺旋菌门,Bac:拟杆菌,S-SC:蔗糖酶,S-UE:脲酶,S-NAG:N-β-葡萄糖苷酶,S-ACP:酸性磷酸酶

型的能通过利用 NH_4^+ 和 NO_3^- 获得能量的细菌种群^[33],本研究中浮霉菌门数量随 NH_4^+ 下降而减少,两者呈现的正相关关系印证土壤中与 NH_4^+ 对浮霉菌活性的重要影响。此外,土壤疣微菌门能通过分泌酶促使 NO_3^- 转化为 NH_4^+ ,故疣微菌门与 NH_4^+ 呈负相关,该结果与胡华英对杉木林土壤养分与细菌相对丰度实验结果一致^[34]。由此可见,土壤 pH 值、 NH_4^+ 、DOC 能直接对杉木人工林土壤微生物群落产生重要影响。

3.2 不同林龄杉木林土壤酶活性变化

土壤肥力变化对土壤酶活性影响显著。脲酶活性与土壤氮素的转化密切相关,本研究中脲酶与 NH_4^+ 呈现显著负相关,因此脲酶活性能一定程度反映土壤中的供氮水平。本研究中所测得的土壤基础数据中 NO_3^- 明显偏低,且与脲酶未呈现显著相关性,这主要是由于研究地酸性土壤环境以及位于亚热带季风气候区,酸性土壤环境 NO_3^- 因带负电荷相对于 NH_4^+ 更易于随着淋溶效应流失^[35]。蔗糖酶能促进土壤中碳水化合物的转化,是有机物的分解转化酶,因此能作为土壤有机质的评判指标^[36]本实验中蔗糖酶与 DOC 呈现显著正相关,这与裴丙等的研究结果一致^[37]。酸性磷酸酶能促进土壤有效磷的合成^[38],据报道,酶活性也与土壤 pH 与速效氮呈现显著相关,两者与 AP 都是影响土壤酶活性的主要因素^[39],本研究中的酸性磷酸酶与 β-N-乙酰基葡萄糖苷酶均含量均较低,据 Ai 的研究表明,土壤会对酶活性产生抑制作用^[40]。蔗糖酶与酸性磷酸酶在 15a

到 24a 的生长期阶段出现上升,到过熟林阶段呈现下降趋势,主要是由于在杉木林的生长期阶段,其林下腐殖质累积,林下植被层发育以及营养物质提升,造成酶活性上升。杉木林发育到过熟林阶段后,郁闭度增大使得林内光强减弱,林下条件变差,使得土壤酶活性下降^[41]。

土壤细菌是土壤酶的重要来源,大部分酶活性高低主要受微生物形成代谢释放的活性物质影响,酶催化下的生化反应也能影响微生物活性。因此,细菌群落结构与酶活性具有直接相关性^[42]。本研究中关于酶与细菌的相关性分析表明,放线菌与蔗糖酶呈现极显著正相关,与脲酶呈现极显著负相关,由于放线菌与有机质分泌密切相关,由此说明可溶性有机质含量变化也与脲酶、蔗糖酶存在紧密联系。脲酶与绿弯菌门、变形菌门以及浮霉菌门都有显著相关性,表明这类细菌随着林龄增长出现的群落变化,以及其分泌的活性物质的改变都会对脲酶产生影响。其他未出现显著相关性的微生物与酶,可能是由于两者之间不单纯是单线的影响关系,影响因素还包括真菌以及土壤动植物。

4 结论

随着林龄的增加,不同林龄杉木林细菌结构发生变化,细菌的丰富度以及均匀度均随着林龄增加而上升,幼年林、中龄林、近熟林以及过熟林之间细菌结构差异显著。酸杆菌门与变形菌门为杉木林土壤中主要细菌群落。土壤 DOC 与放线菌门呈现显著相关性,速效氮与浮霉菌门、土壤疣微菌门均呈现显著相关性,表明杉木林龄增长导致的土壤化学性质的变化能对土壤细菌结构产生显著影响。脲酶与铵态氮呈显著负相关,表明脲酶能间接反映杉木林土壤供氮水平。蔗糖酶由于与 DOC 呈现正相关,能促进土壤有机物转化。变形菌门、绿弯菌门、放线菌门、浮霉菌门、硝化螺旋菌门、放线菌门均与土壤酶活性都有较强的相关性。土壤 NH_4^+ 、DOC 等随着林龄增长呈现下降趋势,而这些养分与土壤细菌群落的相对丰度以及土壤酶活性有较强相关性。因此需在杉木人工林种植后期加强土壤氮肥、有机质等的补充,以增强相关细菌与酶活性。

综上,土壤酶活性与土壤养分含量以及细菌群落结构之间联系密切。土壤细菌群落结构与酶活性均可作为土壤质量变化的健康指标,对有效评判杉木林土壤质量变化有重要意义。适当延长杉木人工林种植年限,有利于维护杉木人工林土壤细菌群落多样性与提高土壤质量,以达到可持续经营管理的目的。

参考文献 (References):

- [1] 沈月琴,王枫,张耀启,朱臻,王小玲. 中国南方杉木森林碳汇供给的经济分析. 林业科学, 2013, 49(9): 140-147.
- [2] 衣晓丹. 不同发育阶段杉木人工林土壤理化性质及凋落物养分储量研究[D]. 北京:北京林业大学, 2013.
- [3] 刘素真,孙玉军. 土壤养分与杉木生长的相关性研究. 西北林学院学报, 2015, 30(5): 15-19.
- [4] Schnitzer S A, Klironomos J N, HilleRisLambers J, Kinkel L L, Reich P B, Xiao K, Rillig M C, Sikes B A, Callaway R M, Mangan S A, van Nes E H, Scheffer M. Soil microbes drive the classic plant diversity-productivity pattern. Ecology, 2011, 92(2): 296-303.
- [5] 刘捷豹,陈光水,郭剑芬,杨智杰,李一清,林成芳,杨玉盛. 森林土壤酶对环境变化的响应研究进展. 生态学报, 2017, 37(1): 110-117.
- [6] Zhang C, Liu G B, Xue S, Wang G L. Soil bacterial community dynamics reflect changes in plant community and soil properties during the secondary succession of abandoned farmland in the Loess Plateau. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 97: 40-49.
- [7] 王超群,焦如珍,董玉红,厚凌宇,赵京京,赵世荣. 不同林龄杉木人工林土壤微生物群落代谢功能差异. 林业科学, 2019, 55(5): 36-45.
- [8] 魏志超,黄娟,刘雨晖,贾代东,李惠通,吴鹏飞,刘爱琴. 不同发育阶段杉木人工林土壤细菌类群特征. 西南林业大学学报, 2017, 37(5): 122-129.
- [9] 马玉莹,周德明,梅杰. 杉木林地根际与非根际土壤特性分析. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(7): 120-123.
- [10] He D Y, Cui J, Gao M, Wang W Q, Zhou J, Yang J, Wang J J, Li Y, Jiang C S, Peng Y. Effects of soil amendments applied on cadmium availability, soil enzyme activity, and plant uptake in contaminated purple soil. Science of the Total Environment, 2019, 654: 1364-1371.
- [11] 严绍裕. 不同林龄湿地松林土壤酶活性与土壤养分特征. 森林与环境学报, 2020, 40(1): 24-29.
- [12] Xu Y X, Du A P, Wang Z C, Zhu W K, Li C, Wu L C. Effects of different rotation periods of Eucalyptus plantations on soil physiochemical properties, enzyme activities, microbial biomass and microbial community structure and diversity. Forest Ecology and Management, 2020, 456: 117683.
- [13] 刘爽,王雅,刘兵兵,刘海龙,刘勇. 晋西北不同土地管理方式对土壤碳氮、酶活性及微生物的影响. 生态学报, 2019, 39(12): 4376-4389.
- [14] Huang Z J, Selvalakshmi S, Vasu D, Liu Q Q, Cheng H, Guo F T, Ma X Q. Identification of indicators for evaluating and monitoring the effects of

- Chinese fir monoculture plantations on soil quality. *Ecological Indicators*, 2018, 93: 547-554.
- [15] Guo J F, Yang Y S, Chen G S, Xie J S, Yang Z J. Carbon mineralization of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) soils under different temperature and humidity conditions. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(1): 66-71.
- [16] Margenot A J Nakayama Y Parikh S J. Methodological recommendations for optimizing assays of enzyme activities in soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 125: 350-360.
- [17] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [18] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F D, Costello E K, Fierer N, Peña A G, Goodrich J K, Gordon J I, Huttley G A, Kelley S T, Knights D, Koenig J E, Ley R E, Lozupone C A, McDonald D, Muegge B D, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky J R, Turnbaugh P J, Walters W A, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [19] Liu G Y, Chen L L, Shi X R, Yuan L Y, Lock T R, Kallenbach R L. Changes in rhizosphere bacterial and fungal community composition with vegetation restoration in planted forests. *Land Degradation & Development*, 2019, 30(10): 1147-1157.
- [20] 李娇, 蒋先敏, 尹华军, 尹春英, 魏宇航, 刘庆. 不同林龄云杉人工林的根系分泌物与土壤微生物. *应用生态学报*, 2014, 25(2): 325-332.
- [21] 刘丽, 段争虎, 汪思龙, 胡江春, 胡治刚, 张倩茹, 王书锦. 不同发育阶段杉木人工林对土壤微生物群落结构的影响. *生态学杂志*, 2009, 28(12): 2417-2423.
- [22] Liu X, Wang Y Z, Liu Y H, Chen H, Hu Y L. Response of bacterial and fungal soil communities to Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) long-term monoculture plantations. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 181.
- [23] 刘丽, 徐明凯, 汪思龙, 张倩茹, 王楠, 潘华奇, 胡江春. 杉木人工林土壤质量演变过程中土壤微生物群落结构变化. *生态学报*, 2013, 33(15): 4392-4706.
- [24] 杨安娜, 陆云峰, 张俊红, 吴家森, 徐金良, 童再康. 杉木人工林土壤养分及酸杆菌群落结构变化. *林业科学*, 2019, 55(1): 119-127.
- [25] Zhang G Y, He J Z, Liu F, Zhang L M. Iron-manganese nodules harbor lower bacterial diversity and greater proportions of *Proteobacteria* compared to bulk soils in four locations spanning from North to South China. *Geomicrobiology Journal*, 2014, 31(7): 562-577.
- [26] 张芸, 李惠通, 魏志超, 刘春华, 蒋宗垠, 马祥庆. 不同发育阶段杉木人工林土壤有机质特征及团聚体稳定性. *生态学杂志*, 2016, 35(8): 2029-2037.
- [27] 夏丽丹, 张虹, 杨靖宇, 于姣姣, 周垂帆. 杉木凋落物土壤生态功能研究进展. *世界林业研究*, 2019, 32(2): 7-12.
- [28] Pankratov T A, Ivanova A O, Dedysh S N, Liesack W. Bacterial populations and environmental factors controlling cellulose degradation in an acidic *Sphagnum peat*. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(7): 1800-1814.
- [29] 张晓红, 胡文革, 莫超, 王翠华, 武菲, 郭颀. 艾比湖湿地根际放线菌多样性及其环境响应. *环境科学与技术*, 2015, 38(12): 22-30, 134-134.
- [30] 贾倩民, 陈彦云, 杨阳, 陈科元, 韩润燕. 不同人工草地对于旱区弃耕地土壤理化性质及微生物数量的影响. *水土保持学报*, 2014, 28(1): 178-182, 220-220.
- [31] 曹彦强, 闫小娟, 罗红燕, 贾仲君, 蒋先军. 不同酸碱性紫色土的硝化活性及微生物群落组成. *土壤学报*, 2018, 55(1): 194-202.
- [32] 李常诚, 李倩茹, 徐兴良, 欧阳华. 不同林龄杉木氮素的获取策略. *生态学报*, 2016, 36(9): 2620-2625.
- [33] Ali M, Oshiki M, Awata T, Isobe K, Kimura Z, Yoshikawa H, Hira D, Kindaichi T, Satoh H, Fujii T, Okabe S. Physiological characterization of anaerobic ammonium oxidizing bacterium '*Candidatus nitrifer*'. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(6): 2172-2189.
- [34] 胡华英, 殷丹阳, 曹升, 张虹, 周垂帆, 何宗明. 生物炭对杉木人工林土壤养分、酶活性及细菌性质的影响. *生态学报*, 2019, 39(11): 4138-4148.
- [35] Sinsabaugh R L, Lauber C L, Weintraub M N, Ahmed B, Allison S D, Crenshaw C, Contosta A R, Cusack D, Frey S, Gallo M E, Gartner T B, Hobbie S E, Holland K, Keeler B L, Powers J S, Stursova M, Takacs-Vesbach C, Waldrop M P, Wallenstein M D, Zak D R, Zeglin L H. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters*, 2008, 11(11): 1252-1264.
- [36] 索沛衡, 杜大俊, 王玉哲, 胡亚林, 刘先. 杉木连栽对土壤氮含量和氮转化酶活性的影响. *森林与环境学报*, 2019, 39(2): 113-119.
- [37] 刘善江, 夏雪, 陈桂梅, 卯丹, 车升国, 李亚星. 土壤酶的研究进展. *中国农学通报*, 2011, 27(21): 1-7.
- [38] 裴丙, 朱龙飞, 冯志培, 姜钰蒙, 杨喜田, 孔玉华. 太行山南麓5个林龄侧柏人工林土壤酶活性季节变化. *水土保持研究*, 2018, 25(2): 170-175, 182-182.
- [39] Yan X L, Liao H, Trull M C, Beebe S E, Lynch J P. Induction of a major leaf acid phosphatase does not confer adaptation to low phosphorus availability in common bean. *Plant Physiology*, 2001, 125(4): 1901-1911.
- [40] 李茜, 孙亚男, 林丽, 李以康, 杜岩功, 郭小伟, 杨永胜, 曹广民. 放牧高寒嵩草草地不同演替阶段土壤酶活性及养分演变特征. *应用生态学报*, 2019, 30(07): 2267-2274.
- [41] Ai C, Liang G Q, Sun J W, He P, Tang S H, Yang S H, Zhou W, Wang X B. The alleviation of acid soil stress in rice by inorganic or organic ameliorants is associated with changes in soil enzyme activity and microbial community composition. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, 51(4): 465-477.
- [42] Wang X B, Song D L, Liang G Q, Zhang Q, Ai C, Zhou W. Maize biochar addition rate influences soil enzyme activity and microbial community composition in a fluvo-aquic soil. *Applied Soil Ecology*, 2015, 96: 265-272.