

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2022.004.016

北京海坨山典型林分土壤固氮菌群落特征研究

史策¹, 聂立水^{1*}, 魏一凡¹, 祝琳¹, 杨昊¹,
张润哲¹, 聂浩亮², 王江³, 薄慧娟⁴

(1. 北京林业大学林学院, 北京 100083; 2. 河北农林科学院农业资源与环境研究所, 河北石家庄 050051;
3. 成都市青白江区农业农村局, 四川成都 610300; 4. 山西农业大学资源环境学院, 山西晋中 030000)

摘要: [目的] 探讨北京海坨山不同林分类型下土壤固氮菌多样性和群落结构及其与土壤性质的相关关系, 为暖温带森林土壤氮循环及森林植被恢复提供理论依据。[方法] 选择 4 种典型林分类型 (油松林 (*Pinus tabulaeformis* Carriere)、针阔混交林 (Pine-poplar mixed)、蒙古栎林 (*Quercus mongolica* Fisch)、核桃楸林 (*Juglans mandshurica* Maxim)) 分别设置 3 块 (20 m × 20 m) 标准样地, 采集 0 ~ 20 cm 土层土样, 分析相关土壤性质, 采用高通量测序分析土壤固氮菌多样性和群落结构特征, 并探究不同土壤特性对土壤固氮微生物群落特征的影响。[结果] 4 种林型下共测定出 4 门 6 纲 13 目 16 科 29 属。多样性分析显示, 4 种林型下土壤固氮菌 α 多样性存在显著差异, 具体表现为油松林 > 针阔混交林 > 核桃楸林 > 蒙古栎林。 β 多样性分析显示, 4 种林型土壤固氮菌群落组间差异大于组内差异。在已鉴定的土壤固氮菌中, 各林型以变形菌门为主, 核心菌属为慢生根瘤菌属、广泛固氮自养单胞菌属和斯克尔曼氏菌属。RDA 分析显示, 土壤特性能解释固氮菌群落变异的 65.48%, 其中土壤有机质和全氮含量显著影响 4 种林型下土壤固氮菌群落组成。[结论] 北京海坨山地区土壤固氮菌资源丰富, 不同林型下土壤特性、固氮菌多样性和群落结构差异明显, 其中土壤有机质和全氮含量是显著影响土壤固氮菌群落组成的主要因子。

关键词: 海坨山; 林分类型; 固氮菌; 细菌群落多样性和组成; 土壤特性

中图分类号: S154.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2022)04-0153-09

固氮菌是森林生态系统中重要的功能菌群, 它通过固氮酶的作用把大气中分子态氮还原为植物可利用态氮^[1-2], 为植物生长提供氮素营养。固氮菌在森林生态系统氮循环, 尤其是土壤氮循环中具有重要作用, 其群落多样性及结构组成是土壤氮素固定及维持氮循环平衡的重要指标^[3-4]。研究森林土壤固氮菌群落多样性及组成可对提高土壤氮素水平和森林土壤氮循环机理提供新认识, 可为森林植被恢复和森林经营提供科学依据。

已有研究表明固氮菌群落与植被类型、土壤特

性等因素有互作效应^[5-7]。植物群落通过凋落物和根系分泌物等影响固氮菌的种类和丰度, 而固氮菌通过改变土壤环境、土壤养分矿化等方式影响植物群落^[8]。Templer 研究表明不同树种土壤氮保留能力显著差异^[9], 并且在不同植被类型下土壤固氮菌群落存在显著差异^[10]。土壤中的碳、氮含量及碳氮比显著影响土壤固氮菌的活性及分布^[5,7,11-13]。相较传统研究方法, 高通量测序技术由于其精确性而被广泛应用于微生物的研究中^[14-15], 对于高通量测序检测土壤固氮菌通常选用 *nifH* 作为分子标记基

收稿日期: 2021-10-09 修回日期: 2022-01-27

基金项目: 北京市科委对接国家 2030 京津冀环境综合治理重大工程项目 (Z181100005318004)

* 通讯作者: 聂立水, 博士, 教授, 主要研究方向: 植物营养学. 电话: 13601131465 Email: nielishui@sohu.com

因, 因其是编码铁蛋白组分的基因且高度保守, 在固氮微生物中都可以检测到^[16]。

北半球温带森林在调节全球碳平衡和减缓全球气候变化进程中扮演着重要角色^[17-19], 华北地区是我国暖温带落叶阔叶林的重要分布区域, 北京松山自然保护区是华北地区内保持完好, 植被类型典型且丰富的自然保护区之一^[20], 油松林 (*Pinus tabuliformis* Carriere.) 是保护区最具代表性的植被类型, 区内还分布有核桃楸 (*Juglans mandshurica* Maxim.)、山杨 (*Populus davidiana* Dode.)、白桦 (*Betula platyphylla* Suk.)、蒙古栎 (*Quercus mongolica* Fisch.) 等常见暖温带落叶阔叶林^[21]。目前已有对该地区不同林分类型下土壤细菌和真菌的研究报道^[22], 然而对不同林分下土壤固氮微生物群落特征及其与土壤理化性质之间相互关系的研究未见报道。

本研究以北京松山国家级自然保护区内 4 种典型林分 (油松林、针阔混交林、蒙古栎林、核桃楸林) 下土壤为研究对象, 以固氮酶铁蛋白 *nifH* 基因为分子靶标^[23-24], 采用 Illumina MiSeq 技术分析不同林分类型下土壤固氮菌的群落特征, 探讨该地区固氮菌群落的多样性和结构组成及其与土壤特性的关系, 为了解土壤氮循环提供基础数据, 同时为发挥暖温带森林土壤潜力和森林植被恢复重建等提

供科学依据。

1 研究区概况

研究区位于北京市延庆区松山国家级自然保护区 (115°43'44"~115°50'22" E, 40°29'9"~40°33'35" N)。该区域位处燕山山脉海坨山南麓, 海拔 628~2 198 m, 属暖温带大陆性气候, 年平均气温 8.9 °C, 年平均日照时数 2 836 h, 年蒸发量 1 772 mm, 年降水量 493 mm^[20]。保护区内成土母岩多为花岗岩, 主要土壤类型为山地棕壤、山地褐土和山地草甸土。保护区内植被类型丰富, 包括草甸、灌木、乔木等, 森林覆盖率高达 87.6%。保护区内主要乔木为: 白桦林、油松林、山杨林、核桃楸林、针阔混交林等。

2 研究方法

2.1 样地设置

依据研究区内油松林、针阔混交林、蒙古栎林和核桃楸林 4 种典型林分类型分布情况, 在每种林型下设面积为 20 m × 20 m 3 块标准地, 共 12 块。分别对所选样地进行相关因子调查, 样地基本情况见表 1。样地中土壤类型均为山地棕壤, 石砾较少, 多为壤土、碎屑类结构, 成土母质均为坡积母质, 林龄均为成熟林, 林分起源均为天然林。

表 1 样地基本概况

Table 1 General characteristics of forest stands

林分类型 Stand types	海拔 Elevation/m	坡度 Slope/°	坡向 Aspect	凋落物厚度 Litter depth/cm	郁闭度 Canopy/%	伴生树种 Associated tree species
油松林 <i>Pinus tabuliformis</i> forest	941	18	东 East	7	80	暴马丁香 <i>Syringa amurensis</i> 毛榛 <i>Corylus mandshurica</i>
针阔混交林 Pine-poplar mixed forest	895	27	东南 Southeast	5	85	油松 <i>Pinus tabuliformis</i> 蒙古栎 <i>Quercus mongolica</i> 大花溲疏 <i>Deutzia grandiflora</i> 胡枝子 <i>Lespedeza bicolor</i> 元宝槭 <i>Acer truncatum</i>
蒙古栎林 <i>Quercus mongolica</i> forest	856	23	东北 Northeast	3.5	80	三裂绣线菊 <i>Spiraea trilobata</i> 平榛 <i>Corylus heterophylla</i>
核桃楸林 <i>Juglans mandshurica</i> forest	815	25	东 East	2.5	85	丁香 <i>Syzygium aromaticum</i> 白蜡 <i>Fraxinus chinensis</i>

注: 表中每个林分类型数据为 3 块标准地的平均值。下同。

Note: Data of each stand are mean of three sampling plots. The same below.

2.2 野外调查与采样

于 2019 年 7 月进行野外调查和样品采集。在不同林型下随机设置 3 块 20 m × 20 m 的标准样地, 按五点法采集 0~20 cm 土样, 去除土样内凋

落物和石砾, 混合均匀后用四分法取 100 g 左右的土, 装入无菌自封袋中, 共计 12 份土样放入便携式冰箱带回实验室。一部分放入 -60 °C 冰箱保存, 余下风干研磨用作土壤特性分析。

2.3 土壤理化性质测定

土壤特性采用常规分析方法:土壤 pH 测定采用酸度计法;土壤全氮测定采用凯氏定氮法;土壤碱解氮测定采用碱解扩散法;土壤有效磷测定采用钼蓝比色法;土壤速效钾测定采用醋酸铵-火焰光度计法;土壤有机质测定采用重铬酸钾-外加热法^[25]。

2.4 DNA 提取及 PCR 扩增

使用 Omega Mag-bind soil DNA kit 提取土壤微生物总 DNA,合格后样品保存于-80 °C 冰箱用于 PCR 扩增。扩增引物选择 nifH-F (5'-AAAGGYG GWATCGGYAARTCCACCAC-3') 和 nifH-R (5'-TTGTTSGCSGCRATACATSGCCATCAT-3')^[26],对 *fungene-nifH* 区域进行扩增。每个样品重复扩增 3 次,扩增后的序列委托上海派森诺生物有限公司进行测定。PCR 反应体系:5 × 缓冲液 5 μL; dNTP (2.5 mM) 2 μL; 正向引物 (10 uM) 1 μL; 反向引物 (10 uM) 1 μL; DNA 模板 1 μL; 超纯水 14.75 μL; 快速 pfu DNA 聚合酶 0.25 μL。PCR 扩增条件:98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 30 s, 63.7 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 反应后,取 5 μL 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.5 数据处理与统计分析

根据序列质量初步筛选出高通量测序的原始离

线数据,并把数据上传至 NCBI 平台,序号为: SUB10898702。QIIME2 DADA2 分析进行 OTU 聚类。采用 CD-HIT 方法,根据 97% 的相似性对 OTU 进行分类,以获得每个 OTU 对应的物种分类信息,利用 QIIME 分析微生物 α 和 β 多样性,在门和属分类水平上比较不同林型土壤固氮菌群落结构组成差异。试验数据处理采用 Excel、SPSS24.0 和 R 完成。采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), Duncan 法比较不同林型的土壤特性、固氮菌多样性的差异 ($p < 0.05$)。采用 Pearson 相关系数评价固氮菌多样性与土壤特性之间的相关关系。采用冗余分析 (RDA) 检验固氮菌结构组成与土壤特性的关系。采用 Spearman 相关性检验,分析优势固氮菌和土壤特性的相关性,运用关联热图展现微生物群落组成与土壤特性的关系。

3 结果

3.1 不同林分类型下土壤特性

不同林分类型的土壤特性见表 2。方差分析和多重比较表明,土壤有机质、全氮及速效钾在 4 种林型之间均有显著差异,碱解氮含量表现为:针阔混交林 > 油松林 > 核桃楸林 > 蒙古栎林,有效磷含量表现为:核桃楸林 > 蒙古栎林 > 针阔混交林 > 油松林。

表 2 不同林分类型下土壤特性

Table 2 Soil properties of forest stands

林分类型 Stand types	pH	有机质 SOM/(g·kg ⁻¹)	全氮 TN/(g·kg ⁻¹)	碱解氮 AN/(mg·kg ⁻¹)	有效磷 AP/(mg·kg ⁻¹)	速效钾 AK/(mg·kg ⁻¹)
Pt	6.3 ± 0.26 ab	70 ± 2.6 d	1.6 ± 0.070 d	247 ± 10 b	2.8 ± 0.11 a	378 ± 15 d
Mix	6.9 ± 0.35 c	59 ± 2.9 c	1.3 ± 0.060 c	315 ± 17 c	2.8 ± 0.14 a	95 ± 4.7 a
Qm	5.9 ± 0.24 a	33 ± 1.4 a	0.88 ± 0.030 a	68 ± 2.8 a	3.8 ± 0.16 b	174 ± 7.1 c
Jm	6.5 ± 0.27 bc	42 ± 1.7 b	1.1 ± 0.040 b	77 ± 3.1a	14 ± 0.58 c	142 ± 5.8 b

注: Pt 油松林 (*Pinus tabuliformis* Carriere forest); Mix 针阔混交林 (Pine-poplar mixed forest); Qm 蒙古栎林 (*Quercus mongolica* Fisch forest); Jm 核桃楸林 (*Juglans mandshurica* Maxim forest)。表中数据为平均值±标准偏差;不同小写字母表示不同林分土壤特性指标在 0.05 水平上存在显著差异。下同 (表 3)。

Note: Pt, *Pinus tabuliformis* forest; Mix, Pine-poplar mixed forest; Qm, *Quercus mongolica* forest; Jm, *Juglans mandshurica* forest. The data in the table is the mean ± standard deviation; Different lowercase letters indicate that the properties indexes of soil samples of different forest stands are significantly different at 0.05 level. The same below (Table 3).

3.2 不同林分类型下土壤固氮菌多样性

3.2.1 不同林分类型下土壤固氮菌 α 多样性 不同林分类型下土壤固氮菌 α 多样性指数的统计结果见表 3, Chao1 指数由高到低表现为:油松林 >

针阔混交林 > 核桃楸林 > 蒙古栎林,核桃楸林和蒙古栎林之间差异不显著 ($p < 0.05$)。Shannon 指数由高到低表现为:油松林 > 针阔混交林 > 核桃楸林 > 蒙古栎林,针阔混交林和核桃楸林之间

表 3 不同林分类型下土壤固氮菌 α 多样性指数
Table 3 Alpha diversity index of soil nitrogen-fixing bacteria of forest stands

林分类型 Stand types	Chao1 指数 Chao1 index	Shannon 指数 Shannon index
Pt	486.28 ± 30.95 c	4.60 ± 0.23 c
Mix	398.21 ± 16.14 b	3.63 ± 0.15 b
Qm	264.29 ± 24.08 a	2.68 ± 0.38 a
Jm	266.48 ± 12.22 a	3.44 ± 0.25 b

差异不显著 ($p < 0.05$)。

3.2.2 不同林分类型下土壤固氮菌 β 多样性 为进一步明晰样本间在群落物种组成上的差异性，基于 Bray-Curtis 距离算法并采用 PCoA 分析衡量 4 种林型土壤固氮菌群落物种组成的相似度。图 1 表明，每种林型的 3 个重复均聚类于同一象限，且每种林分集合间距较大，PCo1 和 PCo2 分别解释变量方差的 41.7%、21.5%，两者累计贡献率达 63.2%。表明 4 种林分类型下土壤固氮菌群落组间差异远大于组内差异。

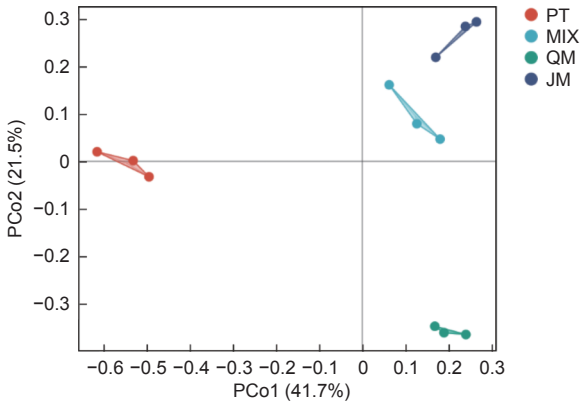


图 1 不同林型下土壤固氮菌群落主坐标分析 (PCoA)
Fig. 1 Principal coordinate analysis (PCoA) analysis of soil nitrogen-fixing bacteria of different forest stands

3.3 不同林分类型下土壤固氮菌群落组成及丰度差异物种分析

为解析不同林型下土壤固氮菌群落结构的变异规律，对聚类后的 OTU 代表序列进行物种注释。4 种林型土壤样品中的 OTU 隶属于 4 门 6 纲 13 目 16 科 29 属。将相对丰度低于 1% 以及在该水平上没有注释结果的归于 Others。4 种林型土壤固氮菌在门和属水平上的群落组成见图 2。

在门分类水平上 (图 2A)，4 种林型土壤固氮菌均以变形菌门 (*Proteobacteria*) 为主，其相

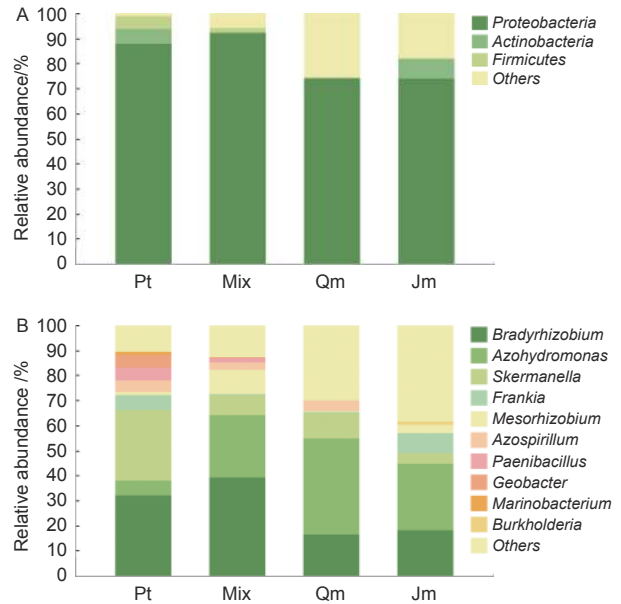


图 2 不同林型土壤固氮菌在门和属水平上的群落组成
Fig. 2 The soil nitrogen-fixing bacteria community compositions of different forest stands on phylum (a) and genus (b) level

对丰度范围是 91.87%~73.89%。变形菌门的组成比例在针阔混交林土壤中最高 (91.87%)，在蒙古栎林中比例最低 (73.89%)。同时在 4 种林型中还含有酸杆菌门 (*Acidobacteria*)，其相对丰度范围是 7.91%~0.40%。另外，厚壁菌门 (*Firmicutes*) 仅存在于油松林和针阔混交林土壤中，含量分别为 4.97% 和 1.76%。虽然群落组成相似，但是各菌门含量差异显著。

在属水平上，取所有样本中平均相对丰度前 10 位的菌群，结果表明 4 种林型下共有菌属为慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)，相对丰度为 39.24%~16.36%、广泛固氮氢自养单胞菌属 (*Azohydromonas*)，相对丰度为 38.48%~5.98%、斯克尔曼氏菌属 (*Skermanella*)，相对丰度为 28.24%~4.41%、弗兰克氏菌属 (*Frankia*)，相对丰度为 7.91%~0.40%、中生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*)，相对丰度为 9.69%~0.34%、固氮螺菌属 (*Azospirillum*)，相对丰度为 4.64%~0.17%。地杆菌属 (*Geobacter*) 仅存在于油松林和针阔混交林下土壤中，海细菌属 (*Marinobacterium*) 仅存在于油松林下土壤中，伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia*) 仅存在于核桃楸林下土壤中。

按照 97% 序列相似性划分 OTU，根据 Bray-

curtis 指数计算距离,得到相似性矩阵,进行群落结构差异分析。由 Venn 图可见(图 3),4 种林型下共有 OTUs 数目为 53 个。其中,油松林与针阔混交林共有 OTUs 数目为 124 个,针阔混交林与蒙古栎林、核桃楸林共有 OTUs 数目 78 个,同为阔叶林的蒙古栎林与核桃楸林共有 OTUs 数目为 181 个。油松林土壤中所含特有 OTUs 数量最多为 448 个,核桃楸林土壤中特有 OTUs 最少为 71 个。

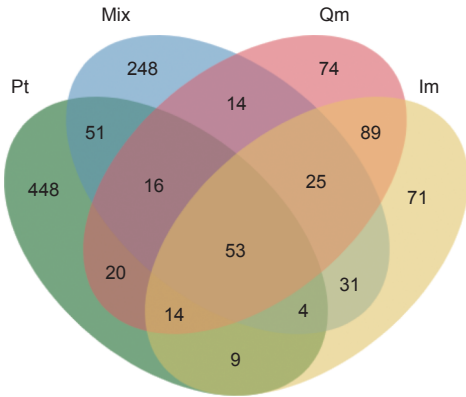


图 3 不同林型下土壤固氮菌的群落差异分析

Fig. 3 The variance analysis of soil nitrogen-fixing bacteria community of different forest stands

3.4 不同林型下土壤固氮菌群落与土壤理化因子的关联分析

3.4.1 土壤特性与土壤固氮菌群多样性的关系

土壤特性与固氮菌的 α 和 β 多样性的相关性分析如表 4 所示。固氮菌 α 多样性与土壤有机质、全氮和速效钾呈极显著正相关,碱解氮与 Chao1 指数呈极显著正相关,与 Shannon 指数呈显著正相关,土壤有效磷与 Chao1 指数呈显著负相关。 β

表 4 土壤性质和固氮菌群落 α 和 β 多样性的相关性系数

Table 4 Correlation coefficients between soil properties and α , β diversity of soil nitrogen-fixing bacteria community

土壤特性 Soil properties	Chao1 指数 Chao1 index	Shannon 指数 Shannon index	β 多样性 β -diversity
pH	-0.385	0.21	0.158
SOM	0.917**	0.833**	-0.718**
TN	0.903**	0.923**	-0.793**
AN	0.779**	0.596*	-0.376
AP	-0.582*	-0.18	0.397
AK	0.672**	0.672**	0.886**

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

Note: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

多样性数值为相应两个样本之间距离(距离矩阵的类型依据算法参数选择而定)。固氮菌的 β 多样性与土壤有机质和全氮呈极显著负相关,这与 α 多样性相反,而 β 多样性与土壤速效钾呈及显著正相关。

3.4.2 土壤特性与土壤固氮菌群落组成的关系

采用冗余分析(Redundancy analysis, RDA)探究影响 4 种不同林型下土壤固氮菌群落组成的环境因子(图 4)。主成分 1(48.85%)和主成分 2(16.63%)累计解释土壤固氮菌群落结构变异的 65.43%。土壤全氮和有机质是影响土壤固氮菌群落组成的主要土壤特性因子。

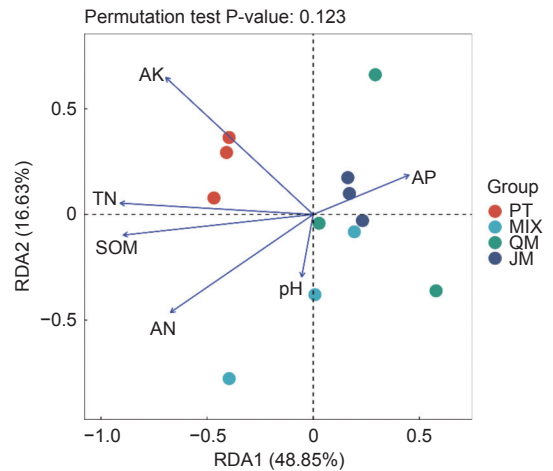


图 4 不同林型下土壤固氮菌群落与土壤特性的冗余分析

Fig. 4 Redundancy analysis (RDA) between soil properties and soil nitrogen-fixing bacteria community of different forest stands based on Bray-Curtis

采用 Spearman 相关性系数分析 4 种林型土壤特性与土壤固氮菌群落组成的相关性,丰度前 20 菌属的相关性热图(图 5)。其中与土壤速效钾含量呈显著相关的菌属有 9 个,全氮 8 个,有机质 5 个,碱解氮 3 个, pH 2 个。

4 讨论

4.1 不同林分类型下土壤固氮菌多样性及群落结构

不同林分类型的群落结构不同导致凋落物的质量和根系分泌物存在差异,对土壤特性造成影响,从而间接影响固氮菌种间的竞争力,使整个固氮菌的多样性及群落结构发生改变^[27-30]。本研究发现,不同林分类型下土壤固氮菌多样性存在显著差异,且油松林下土壤固氮菌多样性最高,这与牛艳芳对

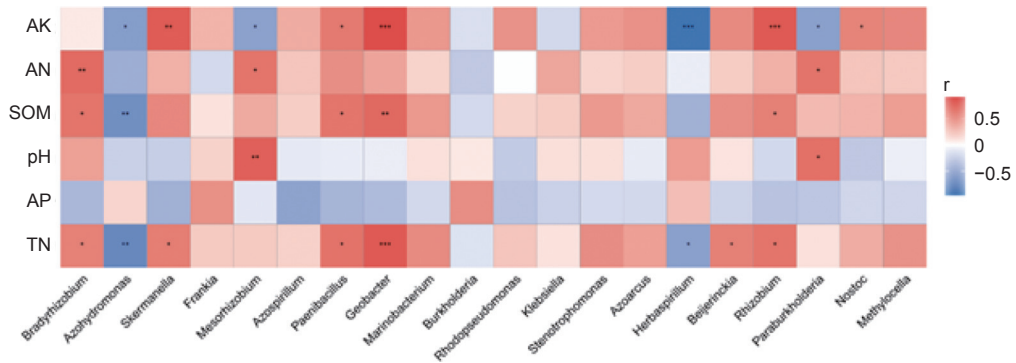


图 5 土壤固氮菌属与环境因子的相关性热图

Fig. 5 Correlation heat maps between the genus of soil nitrogen-fixing bacteria and soil chemical factors.

贺兰山区和大青山的油松林下土壤固氮菌研究一致^[31-32]。固氮菌大部分是异养型微生物，充足的凋落物和丰富的有机质能为固氮菌提供利于它们生长繁殖的养分^[33-34]，本研究中，油松林下凋落物层厚度厚达 7.0 cm，这为固氮菌生长繁殖提供了大量的营养物质。同为落叶阔叶林的蒙古栎林与核桃楸林 Shannon 指数存在显著差异，PCoA 分析固氮菌 β 多样性也明显区分出不同林型下土壤固氮菌，这说明不同树种形成的林分是决定土壤固氮菌多样性的关键因素。

本研究结果显示，不同林分类型下土壤固氮菌群落组成结构存在显著差异，固氮菌优势门、属各占其总种群的 40% 以上，不同林型下土壤固氮菌群落组成结构差异主要是由其丰度不同和稀少种不同导致的。不同微生物群落对环境变化和适应能力存在差别，森林的生物固氮功能也会对不同环境做出差别响应，因此造成不同区域优势固氮微生物产生差异。本研究区固氮菌优势菌门为变形菌门，吕雪丽发现亚热带季风气候森林土壤固氮菌优势菌门为酸杆菌门，温带大陆性山地气候蒙古栎林下土壤固氮菌优势菌门为酸杆菌门和变形菌门。本研究中固氮菌优势菌属为慢生根瘤菌属、广泛固氮自养单胞菌属和斯克尔曼氏菌属。慢生根瘤菌可以在寄主植物根部膨大生成根瘤，它们可固定大气氮为寄主植物可利用氮，而有些固氮菌会在特定条件下以游离状态固定大气氮^[35-36]。尽管斯克尔曼氏菌的基因组内含 *nifH* 基因，但是目前没有发现斯克尔曼氏菌属的物种能够固定 N_2 ^[37]。

4.2 土壤特性对土壤固氮菌的影响

在相同的气候环境条件下，不同树种的根系分泌物不同及凋落物化学组分和分解速率不同^[38-40]，

导致输入到土壤中的有机养分不同，造成林下土壤特性差异显著。相关研究表明，落叶针叶林的凋落物中含有难以分解的木质素、丹宁、蜡等高分子有机物，导致凋落物分解较为缓慢，累积起来凋落物质量较多，厚重的凋落物层覆盖在土壤表面，从而降低了土壤养分被利用的速率，加速了土壤养分的积累并为固氮菌生长提供养分^[41]。本研究中，蒙古栎林下土壤 pH 为 5.87，与其它阔叶林相比，蒙古栎凋落物质量较少，且凋落物中 N 含量较低、C/N 较高、木质素含量较高^[42]等因素导致蒙古栎林下土壤 pH 值偏低。沈秋兰^[43]等对阔叶林改种毛竹后土壤固氮菌多样性变化的研究表明，不同树种下土壤固氮菌丰度和群落多样性差异显著，导致这种结果这不仅是地上植物类型的改变，土壤性质差异也是原因之一。森林土壤固氮菌群落多样性和结构的差异主要是不同的土壤条件所造成的，如土壤 pH、有机质、全氮和有效磷等^[11, 44-47]。本研究通过 Pearson 相关性分析检验固氮菌多样性和土壤环境因子的相关关系，发现土壤特性对不同林型下土壤固氮菌多样性均有不同程度的影响，其中土壤有机质、全氮、碱解氮、有效磷和速效钾均与固氮菌多样性存在相关关系，且大部分土壤特性与固氮菌 α 多样性呈正相关。这可能说明在一定范围内，土壤有效养分含量与固氮菌 α 多样性呈正比。以往研究表明土壤 pH 是影响土壤固氮菌群落结构的重要因子^[48]，但本研究中，固氮菌多样性和群落结构与土壤 pH 并没有相关性，有可能是因为试验区土壤 pH 范围较窄为 5.87~6.93。RDA 分析显示，土壤特性对土壤固氮菌群落结构变化的解释度为 65.43%，土壤全氮和有机质是影响土壤固氮微生物群落组成的主要土壤特性因子。对于固氮菌来说，固氮过程会消耗大量用于生长的碳、氮等能源

物质,土壤氮和碳含量不仅是影响土壤固氮菌群落结构和功能的重要因素,而且对调节土壤氮循环起到一定作用^[49]。图5表明,不同种类的固氮菌与土壤性质的相关关系结果差异很大,相关性分析表明慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)与土壤全氮、碱解氮和有机质呈正相关关系。研究表明慢生根瘤菌是化能自养型细菌^[50],且慢生根瘤菌具有很强的固定CO₂的能力^[51],并在所有土壤中存在。它可以使还原态的无机物作为能源,例如NH₄⁺、NO₂⁻、S₂⁻、H₂S、H₂和Fe²⁺等作为自生长的能源。

综上,林分类型、土壤特性、固氮菌三者之间相互影响,存在协同演变机制。然而影响土壤固氮菌的因子还有很多,例如凋落物、季节变化、地理位置、氮沉降等生态环境因子^[52],并且微生物群落的分布并非是均匀的^[53],不同样点间局部植被和环境的差异可能引发土壤固氮菌性质差异,因此还需要增加重复样品采集数量,多尺度地来探讨其对土壤固氮菌的影响。在今后研究中,有必要综合考虑微生物特征及其影响因素,具体分析固氮菌与植物、土壤之间的耦合机制。

5 结论

不同林分类型下土壤固氮菌群落多样性及结构组成存在显著差异。 α 多样性分析显示油松林下土壤固氮菌多样性最高, β 多样性显示4种林分类型下土壤固氮菌群落组间差异远大于组内差异。本研究区优势菌门为变形菌门,优势菌属为慢生根瘤菌属、广泛固氮自养单胞菌属和斯克尔曼氏菌属。冗余分析显示土壤特性能解固氮菌群落结构变异的65.43%,土壤全氮和有机质是影响土壤固氮菌群落组成的主要土壤特性因子。林分类型、土壤特性和土壤固氮菌具有紧密的联系,研究土壤固氮菌的群落多样性及结构组成必须考虑林分类型和土壤性质的影响。

参考文献:

[1] 牛艳,闫伟,陈立红,等.阿尔山国家森林公园自然保护区杨树根际土壤固氮菌多样性及特性研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2018,46(3):79-86.

[2] 刘彩霞,赵京京,焦如珍.杉木林土壤中固氮功能细菌的生长特性研究[J].林业科学研究,2018,31(4):98-103.

[3] 张武,杨琳,王紫娟.生物固氮的研究进展及发展趋势[J].云南农业大学学报:自然科学,2015,30(5):810-821.

[4] 冯晓敏,杨永,任长忠,等.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[J].中国农业大学学报,2016,21(1):22-32.

[5] 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[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2011, 77(3): 911-919.

[6] Mirza B S, Potisap C, Nusslein K, et al. Response of free-living nitrogen-fixing microorganisms to land use change in the Amazon rainforest[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2014, 80(1): 281.

[7] Wang J, Zhang D, Zhang L, et al. Temporal variation of diazotrophic community abundance and structure in surface and subsoil under four fertilization regimes during a wheat growing season[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2016, 216: 116-124.

[8] 刘璐,何寻阳,杜虎,等.喀斯特土壤固氮微生物群落与植被/土壤的关系[J].生态学报,2017,37(12):4037-4044.

[9] Templer P H. Direct and indirect effects of tree species on forest nitrogen retention in the Catskill Mountains [D]. New York Cornell University, 2001.

[10] 王磊,梁非凡,杨军钱,等.亚热带主要造林树种土壤氮保留及相关功能的微生物特征[J].林业科学,2020,56(8):27-37.

[11] Reed S C, Townsend A R, Cleveland C C, et al. Microbial community shifts influence patterns in tropical forest nitrogen fixation[J]. Oecologia, 2010, 164(2): 521-531.

[12] Wardle D A, Bardgett R D, Klironomos J N, et al. Ecological linkages between aboveground and belowground biota[J]. Science, 2004, 304(5677): 1629-1633.

[13] Keeling A A, Cook J A, Wilcox A. Effects of carbohydrate application on diazotroph populations and nitrogen availability in grass swards established in garden waste compost[J]. Bioresource Technology, 1998, 66(2): 89-9.

[14] 陈玉真,王峰,吴志丹,等.林地转变为茶园对土壤团聚体及渗透性能的影响[J].水土保持学报,2018,32(5):134-139.

[15] Schmidt P A, Bálint M, Greshake B, et al. Illumina metabarcoding of a soil fungal community[J]. Soil Biology Biochemistry, 2013, 65: 128-132.

[16] 徐鹏霞,韩丽丽,贺纪正,等.非共生生物固氮微生物分子生态学研究进展[J].应用生态学报,2017,28(10):3440-3450.

[17] Kriiska K, Frey J, Asi E, et al. Variation in annual carbon fluxes affecting the SOC pool in hemiboreal coniferous forests in Estonia[J]. Forest Ecology and Management, 2018, 433: 419-430.

[18] 吕超群,孙书存.陆地生态系统碳密度格局研究概述[J].植物生态学报,2004(5):692-703.

[19] Lützw M V, Kögel knabner I, Ekschmitt K, et al. Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions-a review[J]. European

- Journal of Soil Science, 2006, 57(4): 426-445.
- [20] 聂浩亮, 薄慧娟, 张润哲, 等. 北京海坨山典型林分土壤有机碳含量及有机碳密度垂直分布特征[J]. 林业科学研究, 2020, 33(6): 155-162.
- [21] 赵娜, 鲁绍伟, 李少宁, 等. 北京松山自然保护区典型植物群落物种多样性研究[J]. 西北植物学报, 2018, 38(11): 2120-2128.
- [22] 范雅倩, 安菁, 梁晨. 北京市松山国家级自然保护区典型植被群落的土壤微生物群落结构特征[J]. 北方园艺, 2021(1): 81-86.
- [23] Poly F, Ranjard L, Nazaret S, et al. Comparison of nifH gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 2255-2262.
- [24] Gaby J C, Daniel H Buckley. A comprehensive aligned nifH gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria[J]. Database, 2014, 2014: bau001.
- [25] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京, 中国农业出版社, 1999
- [26] Szilagyi-Zecchin V, Ikeda A, Hungria M, et al. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture[J]. AMB Express, 2014, 4(1): 1-9.
- [27] Akhtar N, D Goyal, Goyal A. Physico-chemical characteristics of leaf litter biomass to delineate the chemistries involved in biofuel production[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016, 62: 239-246.
- [28] Dilworth M J. Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses[M]. Berlin. Springer Netherlands, 2007
- [29] Ehrenfeld J G, Ravit B, Elgersma K. Feedback in the plant-soil system[J]. Annual Review of Environment and Resources, 2005, 30(1): 75-115.
- [30] 王邵军, 阮宏华. 土壤生物对地上生物的反馈作用及其机制[J]. 生物多样性, 2008(4): 407-416.
- [31] 牛艳芳, 陈立红, 闫伟. 贺兰山地区油松根际固氮菌的多样性研究[J]. 湖南林业科技, 2016, 43(5): 17-21.
- [32] 牛艳芳, 王飞宇, 陈立红, 等. 大青山油松根际固氮菌的多样性研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(22): 1-3.
- [33] 张路, 王杰, 王向涛, 等. 不同恢复方式对退化高寒草甸土壤 nifH 和 chiA 微生物群落结构的影响[J]. 应用生态学报, 2021, 32(12): 4349-4358.
- [34] 吕雪丽, 赵永鹏, 林清火, 等. 我国典型森林土壤微生物驱动的氮代谢途径特征解析[J]. 环境科学, 2021, 42(10): 4951-4958.
- [35] 陆梅. 纳帕海湿地退化对土壤微生物群落结构及多样性的影响[D]. 北京, 北京林业大学, 2018
- [36] 王媛. 生物炭配施植物根际促生菌(PGPR)对作物生长及土壤理化和生物性状的影响[D]. 泰安, 山东农业大学, 2019
- [37] Berg A, Danielsson A, Bo H S. Transfer of fixed-N from N₂-fixing cyanobacteria associated with the moss *Sphagnum riparium* results in enhanced growth of the moss[J]. Plant & Soil, 2013, 362(1-2): 271-278.
- [38] Grayston S J, Prescott C E. Microbial communities in forest floors under four tree species in coastal British Columbia[J]. Soil Biology Biochemistry, 2005, 37(6): 1157-1167.
- [39] Ge X G, Zeng L X, Xiao W F, et al. Dynamic of leaf litter stoichiometric traits dynamic and its relations with decomposition rates under three forest types in Three Gorges Reservoir Area[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 35(3): 779-787.
- [40] Bray S R, Kitajima K, Mack M C. Temporal dynamics of microbial communities on decomposing leaf litter of 10 plant species in relation to decomposition rate[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2021, 49(1): 30-37.
- [41] 张新平, 王襄平, 朱彪, 等. 我国东北主要森林类型的凋落物产量及其影响因素[J]. 植物生态学报, 2008(5): 1031-1040.
- [42] Gao J, F Kang, Han H. Effect of litter quality on leaf-litter decomposition in the context of home-field advantage and non-additive effects in temperate forests in China[J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2016, 25(5): 1911-1920.
- [43] 沈秋兰, 何冬华, 徐秋芳, 等. 阔叶林改种毛竹(*Phyllostachys pubescens*)后土壤固氮细菌nifH基因多样性的变化[J]. 植物营养与肥料学报, 2016, 22(3): 687-696.
- [44] Nadine Herolda, Ingo Schöning, Jessica L, et al. Soil property and management effects on grassland microbial communities across a latitudinal gradient in Germany[J]. Applied Soil Ecology, 2014, 73: 41-50.
- [45] Wu M, Qin H, Zhe C, et al. Effect of long-term fertilization on bacterial composition in rice paddy soil[J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(4): 397-405.
- [46] Tai X S, Mao W L, Liu G X, et al. High diversity of nitrogen-fixing bacteria in the upper reaches of the Heihe River, northwestern China[J]. Biogeosciences, 2013, 10(8)
- [47] Teng Q, Sun B, Fu X, et al. Analysis of nifH gene diversity in red soil amended with manure in Jiangxi, south China[J]. The Journal of Microbiology, 2009, 47(2): 135-141.
- [48] Zhang X, Wei L, Michael S, et al. Response of the abundance of key soil microbial nitrogen-cycling genes to multi-factorial global changes[J]. Plos One, 2013, 8(10): e76500.
- [49] Long X, Chen C, Xu Z, et al. Abundance and community structure of ammonia oxidizing bacteria and archaea in a Sweden boreal forest soil under 19-year fertilization and 12-year warming[J]. Journal of Soils and Sediments, 2012, 12(7): 1124-1133.
- [50] 钱明媚, 肖永良, 彭文涛, 等. 免耕水稻土固定CO₂自养微生物多样性[J]. 中国环境科学, 2015, 35(12): 3754-3761.
- [51] Ronald B M, Jane B E. Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle[J]. J. Exp. Bot, 2008(7): 1525-1541.
- [52] 张于光, 王慧敏, 李迪强, 等. 三江源地区不同植被土壤固氮微生物的群落结构研究[J]. 微生物学报, 2005(3): 420-425.

[53] McGill B J, Etienne R S, John S, *et al.* Species abundance distributions: moving beyond single prediction theories to integra-

tion within an ecological framework[J]. *Ecology Letters*, 2007, 10(10): 995-1015.

Characteristics of Soil Nitrogen-Fixing Bacteria Community of Typical Forest Stands at Haituo Mountain, Beijing

SHI Ce¹, NIE Li-shui¹, WEI Yi-fan¹, ZHU Lin¹, YANG Hao¹, ZHANG Run-zhe¹,
NIE Hao-liang², WANG Jiang³, BO Hui-juan⁴

(1. College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, Beijing, China; 2. Institute of Agricultural Resources and Environment, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Science, Shijiazhuang 050051, Hebei, China; 3. Agriculture and Rural Bureau of Qingbaijiang District, Chengdu 610300, Sichuan, China; 4. College of Resource & Environment, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030000, Shanxi, China)

Abstract: [Objective] To provide theoretical evidence relating to forest soil nitrogen circulation and forest vegetation restoration in warm temperate forests, the diversity, composition of soil nitrogen-fixing bacteria community and their relations with soil properties were studied in four different forest types in Songshan National Nature Reserve of Beijing. [Method] Four typical forest stands (*Pinus tabulaeformis* Carriere (Pt), Pine-poplar mixed (Mix), *Quercus mongolica* Fisch (Qm) and *Juglans mandshurica* Maxim (Jm)) were selected with three replicate plots (20 m × 20 m). Soil samples of 0~20 cm soil layer were collected from each plot to analyze soil properties. In this study, real-time quantitative PCR and High-throughput sequencing were used to study the diversity and composition of soil nitrogen-fixing bacteria. Pearson's correlation analysis and redundancy analysis (RDA) were used to examine the soil properties factors driving the community structure and diversity of the soil nitrogen-fixing bacteria. [Result] A total of 4 phyla, 6 classes, 13 orders, 16 families and 29 genera were detected from the soil samples. There were significant differences in the α diversity of soil nitrogen-fixing bacteria in the four forest types with Pt > Mix > Jm > Qm. β -diversity analysis showed that the inter-group differences of soil nitrogen-fixing bacteria communities of the four forest types were greater than the intra-group differences. *Proteobacteria* was the dominant phylum. *Bradyrhizobium*, *Azohydromonas* and *Skermanella* were the dominant genera in all soil samples. Redundancy analysis (RDA) showed that soil properties could explain 65.48% of the variation of soil nitrogen-fixing bacteria community. Soil organic matter and total nitrogen were the main factors affecting the structure and diversity of the soil nitrogen-fixing bacteria community. [Conclusion] There are abundant soil nitrogen-fixing bacteria resources in Haituo Mountain. There are significant differences in soil properties, soil nitrogen-fixing bacteria diversity and community structure under different forest stands. Soil organic matter and total nitrogen are the main soil properties factors that significantly affect the soil nitrogen-fixing bacteria in Haituo Mountains.

Keywords: Haituo Mountains; forest stand; soil nitrogen-fixing bacteria; the diversity and composition of bacteria community; soil properties

(责任编辑: 崔 贝)