

集约种植雷竹林土壤细菌群落结构的演变及其影响因素*

秦 华^{1**} 李国栋² 叶正钱¹ 徐秋芳¹ 曹志洪³

(¹ 浙江农林大学环境科技学院, 浙江临安 311300; ² 浙江农林大学林业与生物技术学院, 浙江临安 311300; ³ 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008)

摘 要 应用 PCR-DGGE 技术研究了雷竹林种植过程中土壤细菌群落结构的变化, 并运用冗余分析(RDA)手段提取雷竹林土壤细菌群落多样性的干扰控制因子. 结果表明: 水稻田改种雷竹后, 土壤细菌群落的 Shannon 指数及丰富度指数均显著增加; 长期的集约种植过程对雷竹林土壤细菌群落结构产生了影响, 主要细菌种群发生了变化, 多样性指数表现为先增加、后期大幅降低的趋势. RDA 分析表明, 土壤 pH、总氮、碱解氮以及速效钾这 4 个变量能够解释高达 76.1% 的样本总变异, 其中土壤 pH 对细菌群落结构影响最大, 但未达到显著水平, 表明长期集约种植的雷竹林土壤细菌群落结构的变化是多种环境因子共同作用的结果.

关键词 集约种植 雷竹林 土壤细菌群落 PCR-DGGE 冗余分析

文章编号 1001-9332(2010)10-2645-07 **中图分类号** S154.36 **文献标识码** A

Evolve ment of soil bacterial community in intensively managed *Phyllostachys praecox* stand and related affecting factors. QIN Hua¹, LI Guo-dong², YE Zheng-qian¹, XU Qiu-fang¹, CAO Zhi-hong³ (¹ School of Environmental Science and Technology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; ² School of Forestry and Bio-technology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; ³ Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2010, 21(10): 2645-2651.

Abstract: By using PCR-DGGE and redundancy analysis (RDA), this paper studied the variations of soil bacterial community structure during the intensive management of *Phyllostachys praecox* stand, and analyzed the soil factors affecting the diversity of the bacterial community. The results showed that after the transformation of paddy field into *P. praecox* stand, the Shannon and richness indices of soil bacterial community increased significantly. Long-term intensive management of *P. praecox* stand altered the community structure of soil bacteria, reflecting in the changes of main bacterial populations and the great decrease after an initial increase of the diversity indices of soil bacterial community. Soil pH, soil total nitrogen, and soil available nitrogen and potassium could explain 76.1% of the total variation of soil bacterial community, and soil pH showed the greatest effect though it was not significant, indicating that the evolvement of soil bacterial community under the long-term intensive management of *P. praecox* stand was the result of the synergistic effects of several soil factors.

Key words: intensive management; *Phyllostachys praecox* stand; soil bacteria community; PCR-DGGE; redundancy analysis.

雷竹 (*Phyllostachy praecox*) 是中国长江以南地区广泛分布的优良笋用竹种, 为了获得更高的经济效益, 在最近十几年来, 雷竹早产高效栽培技术日益

成熟, 并已在生产上大面积推广. 雷竹早产高效栽培技术的核心, 一方面是竹林地表冬季覆盖稻草、竹叶和砻糠等有机物料, 利用有机物料隔绝冷空气侵入土壤以及有机物料腐烂所产生热量来使土壤保持较高温度, 从而达到提前出笋的目的; 另一方面, 在雷竹林地大量施用肥料, 特别是化肥, 从而增加竹笋产

* 浙江省自然科学基金项目(Y3080337)资助.

** 通讯作者. E-mail: qinhua@zafu.edu.cn

2010-03-03 收稿, 2010-07-14 接受.

量.长期集约种植虽然给当地农户带来显著的经济效益,但由于缺乏科学的管理,也产生了一系列生态环境问题,如土壤有机质、全磷、有效磷含量显著增加^[1],土壤氮素含量随着栽培历史的延长而急剧增加并累积,土壤 pH 值出现较大幅度的下降^[2]等.雷竹林土壤性质快速恶化,导致竹林提前退化,土壤中大量的养分元素通过挥发、径流、渗滤等途径对周围的大气和水体环境形成了潜在威胁.

土壤微生物是土壤中物质转化和养分循环的核心驱动力,其多样性影响着土壤生态系统的结构、功能及过程,是维持土壤生产力的重要组分,也是评价自然或人为干扰引起土壤质量变化的重要指标^[3-4].现代分子生物学技术的发展,使土壤微生物研究不再依赖于传统的培养技术,从而为推动土壤微生物多样性研究做出了巨大贡献.变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术以土壤微生物群体的基因组 DNA 为研究对象,通过比较不同处理土壤中各种微生物的 16S rDNA 基因信息来研究微生物多样性,目前已被广泛应用于土壤微生物多样性研究^[5-6].PCR-DGGE 技术虽然能从分子指纹图谱上直观地看出微生物群落之间的差异,但其反映的信息还远远不够,因此还需要结合梯度分析(gradient analysis)方法进行分析处理,以揭示微生物群落与环境因子间的相互关系.而冗余分析(redundancy analysis, RDA)可以将多个环境因子和样本数据进行多元回归,从而获得与物种分布有关的最主要影响变量,冗余分析方法最初广泛应用于植被生态研究,近年来开始大量用于微生物群落结构研究^[7-9].本文在 PCR-DGGE 研究雷竹林土壤细菌群落结构演变特征的基础上,应用冗余分析方法探讨其主要影响因素,旨在为雷竹林土壤质量评价及可持续发展提供科学依据.

1 研究地区与研究方法

1.1 研究地概况

土壤样品采自浙江省临安市锦城镇(30°17.551' N, 119°41.520' E),该地属中纬度北亚热带季风气候,年降水量 1420 mm,年均气温 15.8 °C,年均日照时数 1939 h,无霜期 234 d.雷竹栽培区属低山丘陵地貌,土壤为粉砂岩母质上发育的红壤土类.

雷竹林种植之前均为水稻田,雷竹定植后的前 5 年基本不施肥或施少量复合肥,从雷竹栽培的第 5 年起开始实施集约种植,模式为:每年 11 月下旬至

12 月上旬于雷竹林地表覆盖有机物,以增温避冷保湿.通常在雷竹林地表先覆 10 ~ 15 cm 稻草,再在上面覆盖 10 ~ 15 cm 的砻糠,稻草用量 40 t · hm⁻²,砻糠用量 55 t · hm⁻²,次年 3、4 月揭去表层未腐烂的砻糠,而下层的稻草经过一个冬春的发酵和雨雪水的淋泡已基本腐烂入土.每年施 3 次肥,时间分别为 5 月上旬、9 月中旬和 11 月下旬(覆盖前),每年施肥总量为无机复合肥(N : P : K = 15 : 15 : 15) 2.25 t · hm⁻²和尿素(含 N 46 %) 1.125 t · hm⁻²,或施等量养分的有机肥^[2].

1.2 样品采集与处理

为研究集约种植年限对雷竹林土壤微生物群落结构的影响,分别采集种植历史为 1、4、10、15、20 和 28 a 的雷竹林土壤,同时采集邻近同一母质且地形地貌特征相似的水稻田土壤作为对照.使用多点随机取样法采集各处理 0 ~ 20 cm 土壤样品,装入无菌密封袋,放入冰桶带回实验室.新鲜土样充分混匀后,去除大的石块和植物残体,过 2 mm 钢筛.样品分为两份,一份立即用于提取土壤细菌总 DNA,供微生物群落结构分析使用;另外一份于室内自然风干,研磨过筛后用于土壤基本理化性质分析.

1.3 主要试剂与引物

Power Soil™ Total DNA Isolation Kit 试剂盒购于美国 Mo Bio 公司, *Taq* DNA 聚合酶购于大连 TaKa-Ra 公司,荧光染料 SYBR green I 购于美国 Invitrogen 公司,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成.

1.4 分析方法

1.4.1 土壤理化性质 参照文献[10],土壤 pH 值测定采用 1 : 2.5 土水比,用复合电极测定;总有机质含量采用重铬酸钾-硫酸外加热法测定;总氮采用半微量凯氏定氮法;碱解氮采用碱解扩散法;有效磷采用 Bray 法,盐酸-氟化铵溶液浸提,钼锑抗比色法测定;速效钾采用醋酸铵提取,火焰光度计测定.

1.4.2 土壤总 DNA 的提取及纯化 采用 Power Soil™ Total DNA Isolation Kit 试剂盒提取土壤总 DNA,具体方法参见试剂盒说明书.

1.4.3 土壤 DNA 的 PCR 扩增 采用一对通用引物 F338-GC 和 518r 扩增细菌 16S rDNA 基因 V3 区的一段长约 260 bp 的片段. F338-GC: 5' -CGCCCGC-CGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGCGGCACGGGGGGC-CTACGGGAGGCAGCAG-3'; 518r: 5' -ATTACCGCG-GCTGCTGG-3'. 使用 Bio-Rad 公司的 PTC-200 对土壤总 DNA 进行扩增. 50 μl 反应体系如下: 10×PCR

Buffer (缓冲液) 5.0 μl, MgCl₂ (25 mmol · L⁻¹) 3.0 μl, dNTP (2.5 mmol · L⁻¹) 1.0 μl, 引物 (10 μmol · L⁻¹) 各 0.5 μl, *Taq* DNA 聚合酶(5 U · μl⁻¹) 0.2 μl, 模板 DNA 1.0 μl, 用无菌双蒸水补足至 50 μl. 反应参数: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 1 min, 50 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min. 取 3 μl PCR 反应产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 检测产物及其长度.

1.4.4 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 使用 DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad), 在变性剂梯度为 30% ~60% 的 8% 聚丙烯酰胺凝胶上进行变性梯度凝胶电泳. 电泳前对 PCR 产物定量、校正, 使上样量一致. 在 60 ℃、80 V 条件下电泳 13 h 后, 使用 SYBR green I 染色, 染色结果用 Gel Doc™ EQ (Bio-Rad) 凝胶成像系统成像, 使用 Quantity One 4.4 软件 (Bio-Rad) 进行图像分析.

1.5 数据处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行数据处理, 单因素方差分析比较各处理之间的差异显著性 (α = 0.05). 采用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 4.4 软件进行 DGGE 指纹图谱分析. 使用 Shannon 指数 (*H*)、Margalef 丰富度指数 (*D*) 和 Pielou 均匀度指数 (*E*) 来评价微生物群落的基因多样性^[11], 其计算公式为:

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$$
$$D = (S - 1) / \ln N$$
$$E = H / \ln S$$

式中: *P_i* 为某一条带的强度与同泳道中所有条带总强度的比值, 即 *P_i* = *n_i* / *N*; *n_i* 为物种 *i* 的个体数; *N* 为所有物种的个体总数; *S* 为每一泳道总的条带数.

使用 CANOCO 4.5.1 软件 (Microcomputer Power, Ithaca, USA) 对 DGGE 揭示的细菌群落结构与环境参数进行冗余分析. 以 DGGE 中条带的相对密度值作为微生物物种数据, 使用软件中的 manual selection 选项预选影响最显著的一组环境变量, 采用 499 次的蒙特卡罗排列检验 (MonteCarlo permutation test, 499 permutations, reduced model) 进行显著性检验^[12].

2 结果与分析

2.1 供试土壤的理化性质

由表 1 可以看出, 经过长期的集约种植, 雷竹林土壤有机质、全氮、碱解氮及速效磷含量均呈逐渐升高的趋势, 栽培年限为 28 年的雷竹林土壤养分含量显著高于水稻土以及其他年份的雷竹林土壤 (*P* < 0.05). 土壤速效钾含量总体上也呈显著上升趋势. 随着雷竹集约种植历史的延长, 雷竹林土壤 pH 值显著下降, 栽培 28 年土壤 pH 值为 3.2, 显著低于水稻土及其他年份雷竹林土壤 (*P* < 0.05).

2.2 PCR-DGGE 分析

土壤微生物总 DNA 经过 PCR 扩增后, 均获得特异性较强的 16S rDNA V3 区目标条带. 对 PCR 产物进行 DGGE 分析, 结果如图 1 所示. DGGE 的主要原理是在含有浓度线性递增的变性剂的聚丙烯酰胺凝胶电泳中, 长度相似而序列不同的 DNA 分子有着不同的解链行为, 从而在凝胶的不同位置停止迁移^[13]. 因此, 可以认为某一个特定条带代表了一类特定的微生物种群, 本研究将其设定为代表一个操作分类单元 (OTU).

从图 1 可以看出, 随着雷竹种植年限的延长, DGGE 图谱出现了较明显的差异. 在 7 个样品中, 共

表 1 不同种植年限雷竹林土壤理化性质
Tab.1 Soil characteristics of bamboo stand with different culture years (mean±SD)

处理 Treatment	pH (H ₂ O)	有机质 Organic matter (g · kg ⁻¹)	全氮 Total N (g · kg ⁻¹)	碱解氮 Alkalisable N (mg · kg ⁻¹)	速效磷 Available P (mg · kg ⁻¹)	速效钾 Available K (mg · kg ⁻¹)
对照 CK	6.1±0.2e	42.5±1.3c	1.86±0.21c	187±9c	6±0.3a	100±8a
1a	6.3±0.1e	23.3±0.8a	0.76±0.17a	57±5a	19±0.8a	128±13b
4a	4.9±0.3d	33.2±0.3b	1.30±0.18b	122±5b	21±1.2a	132±8b
10a	3.9±0.1c	69.2±6.7d	2.30±0.13d	241±20d	194±21b	177±10c
15a	3.8±0.2bc	78.8±1.2e	2.45±0.13d	251±12d	217±17b	127±10b
20a	3.5±0.1b	89.9±5.7f	3.05±0.15e	252±13d	273±43c	163±15c
28a	3.2±0.2a	88.3±10.4f	3.75±0.43f	381±46e	370±35d	184±17c

同列不同字母代表差异达显著水平 (*P* < 0.05) Different letters in the same column showed significant difference by Duncan's multiple range tests at 0.05 level.

出现 35 条不同位置的条带,代表了 35 个 OTU. 其中,条带数目最丰富的 4 a、15 a 和 20 a 处理各有 32 条条带,最少的对照处理(水稻土)仅有 10 条条带. 水稻田改种雷竹后,土壤细菌群落无论是数量还是种类均显著增加. 图 1 中条带 h、j 为所有样品的共有条带,条带 h 在种植雷竹后亮度显著增加,随着种植年限的延长,呈现出逐渐降低的趋势,而条带 j 与之相反,随着种植年限的延长,特别是实施集约种植措施后条带亮度明显增加. 也有一些细菌种群,在刚种植雷竹(条带 b、c、e、f、g)或实施集约种植措施后(条带 a、d)其数量大大增加,然而随着集约种植年限的延长,受到外界不良条件的胁迫而降低甚至消失. 条带 i、k、l 所代表的种群,只有在实施集约种植措施之后,其数量才明显的增加.

采用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 4.4 软件分析 DGGE 指纹图谱,并使用 UPGMA 算法对样本的 DGGE 图谱进行聚类分析. 由图 2 可以看出,从水稻田改种雷竹后,土壤微生物群落结构发生了较大变化,水稻田土壤单独为一簇,而雷竹林集约种植过程中,土壤细菌群落结构较相似,但经过长期的集约种植后,土壤微生物群落结构再次改变,种植 28 a 的雷竹林土壤微生物群落结构与其他雷竹林土壤的相似度较低.

通过软件分析 DGGE 图谱上每个条带的强度,利用公式计算每个土壤样品的多样性指数(表 2). 结果表明,对照和各处理在 Shannon 指数及丰富度上存在较大差异,说明雷竹栽培在很大程度上影响

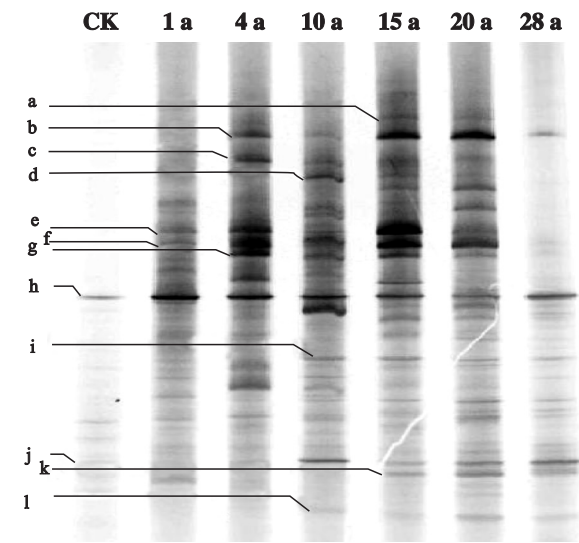


图 1 雷竹林土壤样品的 DGGE 分析
Fig.1 DGGE analysis of soil sample in *Phyllostachy praecox* stands.
a~l: 条带 Band.

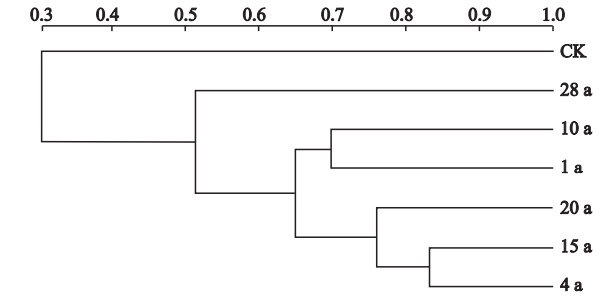


图 2 雷竹林土壤样品细菌群落结构的聚类分析
Fig.2 Cluster analysis of bacteria community in soils of *Phyllostachy praecox* stands.

表 2 土壤细菌群落结构多样性指数
Tab.2 Diversity indices of soil bacteria community

处理 Treatment	Shannon 指数 Shannon index (H)	丰富度 Richness (D)	均匀度 Evenness (E)
对照 CK	2.28	2.53	0.988
1 a	3.27	7.58	0.981
4 a	3.35	8.71	0.968
10 a	3.29	8.15	0.967
15 a	3.32	8.71	0.957
20 a	3.39	8.71	0.977
28 a	3.07	6.18	0.980

了土壤微生物群落结构的多样性. 不同种植年限的雷竹林土壤之间的差异并不显著,但随着种植时间的延长,28 a 雷竹林土壤微生物群落结构的 Shannon 指数及丰富度均明显降低. 对照水稻土的均匀度大于各雷竹林土壤,随着种植年限的延长,土壤微生物群落结构的均匀度呈先降后升的趋势.

2.3 冗余分析

对各样品的 DGGE 条带进行冗余分析,结果如图 3 所示. 冗余分析的二维排序图可以将样本、物种和环境因子反映在同一个图上,从而直观地看出群落、物种分布与环境变量之间的关系. 图中箭头表示环境因子,箭头所处的象限表示环境因子与排序轴间的正负相关性,箭头连线长度表示该环境因子与样本分布相关程度的大小,箭头连线间的夹角代表环境因子间的相关程度. RDA 选入所有的环境因子进行分析,以筛选出有显著解释性的环境变量 ($P < 0.05$),然后通过手动方式进行环境变量的预选,做出排序图. 图 3 结果表明,4 a 和 10 a、15 a 和 20 a 样地较集中,而对照与 1 a、28 a 样地较分散,这与聚类分析的结果基本一致,同时也说明在雷竹林生长成熟的过程中细菌群落结构较相似,而对照处理(水稻土)由于其种植方式不同,细菌群落结构与雷竹林的差异较显著. 另外,28 a 雷竹林样地与其他种植

表 3 土壤细菌群落结构组成的冗余分析
Tab.3 RDA of soil bacteria community compositions

冗余分析指标 Index of RDA	第一排序轴 Axis 1	第二排序轴 Axis 2	第三排序轴 Axis 3	第四排序轴 Axis 4
特征值 Eigenvalues	0.636	0.124	0.094	0.054
样本-环境关联度 Species-environment correlation	0.992	0.977	0.974	0.936
物种累积关联度百分数 Cumulative percentage correlation of species data	63.6	76.1	85.5	90.9
物种-环境关系累积百分数 Cumulative percentage correlation of species-environment relation	70.0	83.6	94.0	100.0

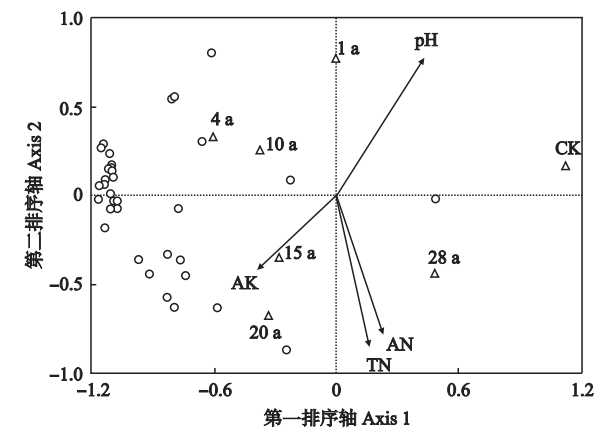


图 3 供试雷竹林土壤样品细菌群落结构的冗余分析
Fig.3 RDA on DGGE band data in soils of *Phyllostachy praecox* stands.
△: 样地 Samples land; ○: 35 个 OTU 35 OTUs; AK: 速效钾 Available K; TN: 全氮 Total N; AN: 碱解氮 Alkalisable N.

年限雷竹林样地较分散,可能是由于长期的集约种植导致土壤细菌群落结构发生了较大变化。

根据 Canoco 的 forward 分析,所有的 6 个环境因子中,土壤 pH 对土壤细菌群落组成影响最大,但并未达到显著水平 ($P>0.05$),而土壤速效钾、全氮和碱解氮的影响虽然也未达到显著性水平,但大于其他环境因子。从图 3 可以看出,土壤 pH 与物种和群落分布的相关性最强,说明群落的分布主要受其影响。土壤全氮、碱解氮与群落的分布也有明显的作用关系,且两者之间高度相关。RDA 分析结果显示,第一排序轴 (Axis 1) 解释了样本中 63.6% 的变异,第二排序轴 (Axis 2) 解释了样本 12.5% 的变异,两者合并解释了样本 76.1% 的总变异 (表 3)。

3 讨 论

土壤微生物多样性是指示土壤质量,特别是人为干扰条件下土壤生物学质量的理想指标。随着分子生物学技术的快速发展,越来越多的研究者不再局限于传统的培养方法,而得以在基因层面上开展

土壤微生物生态的研究,如 PCR-DGGE、T-RFLP、FISH 等技术已经广泛应用于研究各种人为干扰措施对土壤微生物多样性的影响^[14-16]。本研究采用 PCR-DGGE 技术研究集约种植措施对雷竹林土壤微生物群落结构的影响,DGGE 条带表明,水稻田改种雷竹后,土壤细菌群落结构也随之发生了很大变化,无论是种类和数量都大大增加,推测一方面由于土壤氧化还原条件的改变,好氧微生物逐渐占据优势;另一方面,植物的种类也在很大程度上影响土壤微生物的种类。聚类分析结果同样证明了水稻田与雷竹林土壤微生物群落结构的巨大差异。在雷竹林的种植过程中,前 5 年基本不施或只施少量的化肥,虽然人为扰动较小,但雷竹旺盛生长所产生的根系分泌物以及地下竹根鞭对土壤的疏松作用也对土壤微生物群落结构产生了一定影响,土壤中出现了一些明显的优势种群,如成熟雷竹林 (4 a) 土壤中出现条带 b、c、e、f、g 等 (图 1)。条带 h 和 j 是所有处理中的共有条带,说明这两类微生物的适应范围非常广泛,随着外界环境条件的变化,其基本不受影响或者影响较小。在集约种植开始之后,一些新的微生物种群开始出现并逐渐成为长期种植土壤中的主要微生物种群,而先前占优势的一些种群开始减弱甚至最终消失,也说明了雷竹林长期集约种植后,由于环境条件的改变,土壤微生物群落结构发生了较大变化,一些微生物种类因不能适应新的竹林环境而逐渐消失,而另一些微生物种类因能够适应或忍耐新的环境而继续存在于竹林土壤生态系统中并逐渐占据主导地位。

聚类分析以及微生物群落多样性指数均表明,土壤管理措施以及环境条件的改变会显著影响土壤微生物的群落多样性。水稻田在改种雷竹后,Shannon 指数以及丰富度均明显提高,但经过长期的集约种植后,再次降低。Shannon 指数反映了群落中物种的变化度或差异度,受样本总数和均匀度的影响,

一般来说,物种丰富度高且分布较均匀的群落的 Shannon 指数较高^[17]. 研究表明,集约化农业中高强度和高频度的人为活动对土壤生态系统带来了强烈干扰和巨大压力,造成生物种群和功能多样性衰减、土壤的生物化学过程强度减弱,严重影响了土壤生态系统的稳定性及其功能的发挥^[18-19]. 长期大量施肥及冬季覆盖措施明显地改变了雷竹林土壤理化性质及养分形态的分布,种植雷竹林 20 年后,土壤 pH 值降到了 3.5 以下,而速效养分含量显著升高(表 1). 有研究表明,高肥力的太湖地区水稻土微生物生物量 C、N 随化肥用量的增加而显著降低^[20]. 另外,土壤酸化会活化有害重金属元素如铝、锰等,导致有毒物质的释放,对土壤生物造成危害. 薛冬等^[21]发现严重酸化可能是导致茶园及林地土壤微生物多样性降低的主要原因;Hackl 等^[22]研究橡树、山毛榉以及云杉等植被下的林地土壤,发现 pH 值的降低是土壤微生物的主要限制因子. 因此,有机物料和无机肥料的连续大量输入导致的养分积累和土壤严重酸化可能是雷竹林土壤微生物多样性降低的主要原因.

PCR-DGGE 方法虽已广泛应用于环境微生物研究,但目前对试验结果的解释还主要处于定性描述层次,难以揭示特定环境因子和微生物群落的内在联系. 土壤微生境的改变往往造成微生物多样性发生变化,由于各种环境因子之间的协同性、叠加性和连锁性,给确定主要影响因素及开展定量研究造成诸多不便,而 RDA 则直接将感兴趣的环境变量作为约束条件考虑到排序分析中,从而大幅消减了环境变量的规模,可确定对物种群落结构具有最大解释能力的最小变量组^[23]. Marschner 等^[24]采用 RDA 分析了长期施肥对土壤微生物群落的影响,发现土壤有机质含量和碳氮比显著影响了土壤细菌和真菌群落结构. 本研究对 DGGE 结果进行 RDA 分析,结果证实了供试土壤的微生物群落多样性与 pH 值呈负相关,但由于一些微生物对于环境的适应能力较强,并没有表现出快速的群落结构改变,因此没有显著的相关性,也可能与本研究样本数量偏少有一定关系. 另外,土壤氮素的大量积累也对微生物群落结构变化具有一定的贡献率,提示长期大量的氮肥施用是造成土壤生物学特性下降的可能原因之一. RDA 分析已经被应用于土壤动物及微生物生态的研究,其最大优势在于不仅能独立保持各个变量对微生物群落变化的贡献率,而且能最大限度地精简环境变量个数,可为研究者进一步简化分析创造条件^[5,25].

该类分析在土壤微生物生态研究中的应用,可以为研究者更好地了解微生物群落行为、建立土壤微生物对环境因子响应性的监测模型提供科学依据.

4 结 论

本研究表明,长期的集约种植措施显著提高了雷竹林土壤的养分含量,但土壤 pH 值却明显降低. 集约种植导致土壤微生物群落结构发生明显改变,PCR-DGGE 结果表明,水稻田改种雷竹后,土壤微生物群落多样性指数增加,说明种植条件的改变具有较大影响;雷竹林土壤经过长期的集约种植后,微生物群落多样性也随之发生改变,表现为多样性指数降低、优势种群发生更替等. 聚类分析结果同样证明了土壤微生物群落结构随种植条件的改变而发生变化. 利用冗余分析(RDA)手段研究环境因子与微生物群落结构演变的关系,结果表明,土壤 pH 对细菌群落结构影响最大,土壤养分如全氮、碱解氮以及速效钾等也有较大影响. RDA 方法在土壤微生物生态中的应用,有利于加深对微生物环境行为的理解,对更好地监控环境风险具有重要的实用价值.

参考文献

- [1] Qin H (秦 华), Xu Q-F (徐秋芳), Cao Z-H (曹志洪). Soil microbial biomass in long-term and intensively managed *Phyllostachys praecox* stands. *Journal of Zhejiang Forestry College* (浙江林学院学报), 2010, **27** (1): 1-7 (in Chinese)
- [2] Huang F (黄 芳), Cai R-R (蔡荣荣), Sun D (孙达), et al. Soil nitrogen status and estimated nitrogen balance budget in an intensive managed *Phyllostachys praecox* stand. *Plant Nutrition and Fertilizer Science* (植物营养与肥料学报), 2007, **13**(6): 1193-1196 (in Chinese)
- [3] Lin X-G (林先贵), Hu J-L (胡君利). Scientific connotation and ecological service function of soil microbial diversity. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 2008, **45**(5): 892-900 (in Chinese)
- [4] Hu J-L (胡君利), Lin X-G (林先贵), Yin R (尹睿), et al. Spatiotemporal evolvement of soil microbiological characteristics in upland fields with different utilization duration in Cixi, Zhejiang Province. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2008, **19** (9): 1977-1982 (in Chinese)
- [5] Petra M, Pauline FG, Zed R. Microbial community composition and functioning in the rhizosphere of three *Banksia* species in native woodland in Western Australia. *Applied Soil Ecology*, 2005, **28**: 191-201
- [6] Wu F-Z (吴凤芝), Wang S (王 澍), Yang Y (杨阳). Effects of rotation and intercropping on bacterial communities in rhizosphere soil of cucumber. *Chinese*

- Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2008, **19** (12): 2717–2722 (in Chinese)
- [7] Wang J (王 江), Zhang C-B (张崇邦), Chang J (常 杰), *et al.* Effects of *Miscanthus floridulus* on microbial biomass and basal respiration in heavy metals polluted soils. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2008, **19**(8): 1835–1840 (in Chinese)
- [8] Gilbride KA, Frigon D, Cesnik A, *et al.* Effect of chemical and physical parameters on a pulp mill biotreatment bacterial community. *Water Research*, 2006, **40**: 775–787
- [9] Cookson WR, Abaye DA, Marschner P, *et al.* The contribution of soil organic matter fractions to carbon and nitrogen mineralization and microbial community size and structure. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, **37**: 1726–1737
- [10] Lu R-K (鲁如坤). Analysis Methods for Soil and Agrochemistry. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999 (in Chinese)
- [11] Zhang J-T (张金屯). Quantitative Ecology. Beijing: Science Press, 2004 (in Chinese)
- [12] ter Braak CJF, Smilauer P. CANOCO Reference Manual and Cano Draw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (Version 4. 5). US: Microcomputer Power, 2002
- [13] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, **73**: 127–141
- [14] Sakurai M, Suzuki K, Onodera M, *et al.* Analysis of bacterial communities in soil by PCR-DGGE targeting protease gene. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, **39**: 2777–2784
- [15] Thies JE. Soil microbial community analysis use terminal restriction fragment length polymorphisms. *Soil Science Society of America Journal*, 2007, **71**: 579–591
- [16] Dedysh SN, Pankratov TA, Belova SE, *et al.* Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria community composition in an acidic sphagnum peat bog. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**: 2110–2117
- [17] Magurran AE. Ecological Diversity and Its Measurement. Princeton: Princeton University Press, 1988
- [18] Zhang T-L (张桃林), Li Z-P (李忠佩), Wang X-X (王兴祥). Soil degradation and its eco-environmental impact under highly-intensified agriculture. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 2006, **43**(5): 843–850 (in Chinese)
- [19] Yin R (尹 睿), Zhang H-Y (张华勇), Huang J-F (黄锦法), *et al.* Comparison of microbiological properties between soils of rice-wheat rotation and vegetable cultivation. *Plant Nutrition and Fertilizer Science* (植物营养与肥料学报), 2004, **10**(1): 57–62 (in Chinese)
- [20] Lu L (路 磊), Li Z-P (李忠佩), Che Y-P (车玉萍). Effect of different fertilization treatments on soil microbial biomass and enzyme activities in hapli-stagnic anthrosols. *Soils* (土壤), 2006, **38**(3): 309–314 (in Chinese)
- [21] Xue D (薛 冬), Yao H-Y (姚槐应), Huang C-Y (黄昌勇). Genetic diversity of microbial communities in tea orchard soil. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2007, **18**(4): 843–847 (in Chinese)
- [22] Hackl E, Bachmann G, Zechmeister-Boltenstern S. Soil microbial biomass and rhizosphere effects in natural forest stands. *Phyton*, 2000, **40**: 83–90
- [23] Yin K (尹 锴), Cui S-H (崔胜辉), Zhao Q-J (赵千钧), *et al.* Understory diversity prediction of urban forest based on the redundancy analysis (RDA). *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2009, **29**(11): 6085–6094 (in Chinese)
- [24] Marschner P, Kandeler E, Marschner B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, **35**: 453–461
- [25] Bossio DA, Girvan MS, Verchot L, *et al.* Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of Western Kenya. *Microbial Ecology*, 2005, **49**: 50–62

作者简介 秦 华,男,1981 年生,博士研究生,讲师. 主要从事环境微生物生态研究,发表论文 10 余篇. E-mail: qinhua@zafu. edu. cn

责任编辑 肖 红
