方知库
Eco-Environmental
Knowledge Web

环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV
HUANJING KEXUE

- 主办 中国科学院生态环境研究中心
- 出版 科学出版社

2020

Vol.41 No.5
第41卷 第5期

目次

上海大气 PM_{2.5} 来源解析对比:基于在线数据运用3种受体模型 周敏(1997)

不同浓度臭氧对单颗粒气溶胶化学组成的影响 吴梦曦,成春雷,黄渤,李梅,陈多宏(2006)

二次有机气溶胶壳对氯化钠核吸湿性的影响:基于单颗粒微观尺度 张淑佳,徐亮,郭新梅,黄道,李卫军(2017)

城区与县区不同空气质量下碳组分污染特征对比分析 李欣悦,张凯山,邓林俐,向铎鹏,武文琪,殷子渊(2026)

临沂市 PM_{2.5} 和 PM₁₀ 中元素分布特征及来源解析 陆平,赵雪艳,殷宝辉,张楠,王歆华,余浩,杨文,王晓丽(2036)

西安市秋冬季市区与山区微生物气溶胶组成特征及来源 谢雯文,路瑞,慕云飞,戚玉珍,白文艳,李彦鹏(2044)

北京市典型餐饮企业大气污染物排放特征 何万清,王天意,邵霞,聂磊,石爱军(2050)

基于随机森林模型的中国 PM_{2.5} 浓度影响因素分析 夏晓圣,陈菁菁,王佳佳,程先富(2057)

大气污染联合治理分区视角下的中国 PM_{2.5} 关联关系时空变异特征分析 杨文涛,黄慧坤,魏东升,赵斌,彭焕华(2066)

基于地-空观测数据的粤港澳大湾区大气污染调查及时空演变特征 王耀庭,梁加成,郑祚芳,李青春,李威,窦有俊(2075)

龙子祠泉域岩溶地下水水化学特征及成因 唐春雷,郑秀清,梁永平(2087)

三峡水库总磷时空变化特征及滞留效应分析 唐小娅,童思陈,黄国鲜,许光祥,李丹(2096)

三峡水库汛后蓄水期典型支流溶解氧与叶绿素 a 垂向分布特征 杨凡,纪道斌,王丽婧,李虹,李莹杰(2107)

汉丰湖正式运行年水体营养盐分布特征 付迺,倪九派,何丙辉,李天阳,唐毅,钱田,向可翠(2116)

白洋淀水体富营养化和沉积物污染时空变化特征 刘鑫,史斌,孟晶,周云桥,可欣,王铁宇(2127)

新安江水库悬浮颗粒物时空分布、沉降通量及其营养盐效应 史鹏程,朱广伟,杨文斌,许海,朱梦圆,刘明亮,虞左明,吴志旭,郑文婷,王裕成,笄文怡,胡林娜(2137)

不同水文情景下高邮湖、南四湖和东平湖有色可溶性有机物的生物可利用性特征 张柳青,石玉,李元鹏,郭燕妮,周蕾,周永强,张运林,杨艳(2149)

水源水藻类功能群落演替特征及水质评价 李衍庆,黄廷林,张海涵,温成成,杨尚业,林子深,高欣(2158)

人工强制混合对金盆水库水体藻类群落结构时空演替的影响 王晨旭,黄廷林,李楠,齐允之,徐金兰,司凡,张晗,路林超(2166)

雄安新区-白洋淀冬季冰封期水体好氧反硝化菌群落空间分布特征及驱动因素 周石磊,孙悦,岳智丞,张航,王周强,刘世崇,彭瑞哲,苑世超,李再兴,崔建升(2177)

分层型水库水体好氧不产氧光合细菌时空演替特征 张海涵,王燕,黄廷林,王晨旭,路林超,司凡,李楠,刘凯文,闫苗苗,苗雨甜(2188)

大型通江湖泊有色可溶性有机物对不同水文情景的响应 郭燕妮,李元鹏,石玉,张柳青,周蕾,周永强,张运林,韩龙飞(2198)

秦岭北麓河流夏季有色溶解有机物分布特征及影响因素 林子深,黄廷林,杨尚业,温成成,李衍庆,周石磊,宋选社(2210)

长江下游支流水体中多环芳烃的分布及生态风险评估 贾天琪,雷荣荣,武小琳,倪涛涛,孙树睿,郭伟,刘文彬(2221)

太湖水体中 NSAIDs 的时空分布规律和生态风险评估 廉杰,李祎飞,王晓喧,叶彬,邹华,史红星(2229)

8种典型 PhACs 在水中的赋存、生态风险及其对大型溞的影响 徐鑫磊,刘建超,陆光华(2239)

我国南方桉树人工林区水库沉积物污染物的分布特征及迁移规律 朱雅,李一平,罗凡,李荣辉,黄列,程一鑫,蒋裕丰(2247)

基于连续监测的城市内河返黑返臭机制初探:以南宁市二坑溪为例 李永新,王威,何妹,申泰铭(2257)

城郊流域源汇景观格局与水体抗生性的关系 李敏,唐剑锋,陈利顶,赵方凯,冯青郁,杨磊(2264)

城市雨水径流中溶解性有机物的分子化学多样性 聂云汉,陈浩,李磊,朱奕,赵昕,贾其隆,徐慧婷,叶建锋(2272)

方解石/氯磷灰石混合物添加对水体内源磷迁移转化的调控效应和机制 柏晓云,林建伟,詹艳慧,常明玥,吴俊麟,辛慧敏,黄良君(2281)

不同环境条件下水铁矿和针铁矿纳米颗粒稳定性 王智巧,马杰,陈雅丽,翁莉萍,顾亚陶,李永涛(2292)

向日葵秸秆生物炭强化 Fe(III)/S₂O₈²⁻ 体系降解苯甲酸 孙鹏,张凯凯,张玉,张延荣(2301)

非活化单过硫酸盐降解柳氯磺胺吡啶:动力学及机制 丁曦,张学维,周润生,宋哲,严佳颖,周磊,修光利(2310)

贵州某规模化养猪场废水中抗生素的污染特征及去除效果 杨钊,李江,向福亮,李彦澄,马凯,谢锋(2320)

新型填料 A/O 生物滤池处理低碳氨比农村污水脱氮 赵远哲,杨永哲,王海燕,储昭升,常洋,董伟羊,闫国凯,王欢,李丛宇(2329)

贫营养好氧反硝化菌株的脱氮特性及氮/碳平衡分析 文刚,王彤,黄廷林,万琪琪,曹瑞华,寇莉青,杨尚业(2339)

连续流 SNAD 工艺处理猪场沼液启动过程中微生物种群演变及脱氮性能 秦嘉伟,信欣,鲁航,张萍萍,王露蓉,邹长武,郭俊元(2349)

不同培养条件厌氧氨氧化颗粒污泥活性及微生物群落结构差异 姜滢,郭萌蕾,谢军祥,常尧枫,谢嘉玮,陈重军,沈耀良(2358)

反硝化除磷耦合部分亚硝化-厌氧氨氧化一体式工艺的启动 陈亚,印雯,张星星,张钰,宋吟玲,吴鹏,徐乐中(2367)

土壤环境承载力评价体系构建与应用 李笑诺,丁寿康,陈卫平,王夏晖,吕斯丹,刘睿(2373)

磁性生物炭的合成及对土壤重金属污染的钝化效果 王俊楠,程珊珊,展文豪,任强,马晓宇,王洋洋(2381)

还原增溶强化 EGTA 淋洗修复重金属污染土壤 张金永,朱玉婷,王明新,韩莹,葛嘉琦(2390)

不同价态铬和土壤理化性质对大麦根系毒性阈值的影响 付平南,贡晓飞,罗丽韵,王琪,李花粉(2398)

生物炭施用对紫色土旱坡地土壤氮流失形态及通量的影响 王舒,王子芳,龙翼,严冬春,慈恩,徐国鑫,李娇,高明(2406)

长期撂荒恢复土壤团聚体组成与有机碳分布关系 王兴,钟泽坤,张欣怡,吴少君,卢绪巧,杨改河,任成杰,韩新辉(2416)

施用生物炭对壤土土壤微生物代谢养分限制和碳利用效率的影响 王强,耿增超,许晨阳,郭靖宇,李倩倩,刘莉丽,赵汉红,杜旭光(2425)

间种高粱及施用大颗粒尿素对茶园 N₂O 排放的影响 张珂彬,刘新亮,康曼,王毅,沈健林,李勇(2434)

缙云山森林植被类型对土壤 N₂O 相关功能微生物的影响 王盛燕,王富华,罗东海,昌盛,王子芳,高明(2445)

咸水滴灌对棉田土壤 N₂O 排放和反硝化细菌群落结构的影响 郭慧楠,马丽娟,黄志杰,李美琪,侯振安,阎伟(2455)

有机质提升对酸性红壤氮循环功能基因及功能微生物的影响 储成,吴赵越,黄欠如,韩成,钟文辉(2468)

模拟酸雨对毛竹阔叶林过渡带土壤真菌结构及其多样性的影响 王楠,潘小承,王传宽,白尚斌(2476)

海洋沉积物中细菌 DNA 和 RNA 水平群落差异 李明月,杨雨虹,米铁柱,贺惠,甄毓(2485)

2003~2013年中国湿地变化的空间格局与关联性 周婷,马姣姣,徐颂军(2496)

《环境科学》征订启事(2086) 《环境科学》征稿简则(2187) 信息(2209,2263,2309)

缙云山森林植被类型对土壤产 N₂O 相关功能微生物的影响

王莹燕, 王富华, 罗东海, 吕盛, 王子芳, 高明*

(西南大学资源环境学院, 重庆 400715)

摘要: 为明确亚热带不同森林植被对土壤涉氮功能基因(*amoA*、*nirS*、*nosZ*)微生物群落和功能的影响,以缙云山5种森林植被类型(针叶林、阔叶林、针-阔混交林、竹林以及荒草地)土壤为研究对象,采用末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)和荧光定量PCR(qPCR)等分子技术,结合与氮素循环相关的微生物酶活,研究不同森林植被土壤涉氮微生物丰度、群落结构及其功能的差异。结果表明:①缙云山国家自然保护区土壤反硝化酶活显著高于硝化势,且针叶林土壤2种酶活均显著低于其他植被类型($P < 0.05$)。此外,可溶性有机碳、土壤含水量和总氮是影响酶活的主要环境因子。②qPCR结果显示,竹林土壤涉氮功能微生物的丰度最高,而针叶林土壤最低。3个涉氮功能微生物的丰度均与可溶性有机碳、总氮、有效氮、总钾以及有效钾显著相关($P < 0.01$)。③基于T-RFLP数据,阔叶林土壤涉氮微生物 α -多样性指数最高,而竹林最低。主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)显示:在不同植被间,氨氧化古菌群落结构表现出显著差异,针叶林土壤涉氮功能微生物群落结构最独特。此外,基于距离的冗余分析(distance-based redundancy analysis, db-RDA)表明:涉氮功能微生物群落结构主要受可溶性有机碳($P < 0.001$)、有效氮($P < 0.002$)和土壤含水量($P < 0.001$)调控。④土壤反硝化酶活主要受*nirS*反硝化菌与氨氧化古菌的丰度和涉氮功能微生物的群落结构的影响;而硝化势主要受氨氧化古菌的丰度影响。由上可知,亚热带森林植被显著影响土壤涉氮功能微生物的丰度和群落结构,进而改变其调控土壤的氮素循环的功能。可为我国亚热带森林土壤微生物与N₂O释放的耦合机制提供基础数据。

关键词: 亚热带森林; 植被类型; 涉氮酶活; 涉氮功能微生物; 群落结构

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2020)05-2445-10 DOI: 10.13227/j.hjxx.201910230

Effects of Different Forest Vegetation Types on Soil Nitrogen-Related Microbial Communities and Functions in Jinyun Mountain

WANG Ying-yan, WANG Fu-hua, LUO Dong-hai, LÜ Sheng, WANG Zi-fang, GAO Ming*

(College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: To clarify the response of a nitrogen-related microbial community and function to different vegetation types in subtropical forest, soil samples were collected for analysis from the topsoil of five vegetation types in the Jinyun Mountain National Nature Reserve, i. e., coniferous forest, broadleaf forest, mixed broadleaf-coniferous forest, *P. pubescens* forest, and grassland. To analyze the microbial abundance, community, and function discrepancy between different vegetation soils, multiple molecular techniques, such as terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis, and nitrogen-related microbial enzyme activity procedures were used. The results showed: ① The denitrifying enzyme activity was much higher than nitrifying potential in Jinyun Mountain National Nature Reserve, and the two enzyme activities were much lower in coniferous forest soil than in the other vegetation soils ($P < 0.05$). In addition, dissolved organic carbon, soil water content, and total nitrogen were the key environmental factors controlling enzyme activity. ② The qPCR data showed that the abundance of nitrogen-related microbes was highest in *P. pubescens* forest, whereas it was lowest in coniferous forest. The abundances of the three nitrogen-related microbes were all significantly correlated with dissolved organic carbon, total nitrogen, available nitrogen, total potassium, and available potassium ($P < 0.01$). ③ Based on T-RFLP data, the α -diversity of nitrogen-related microbes was highest in broadleaf forest, whereas it was lowest in *P. pubescens* forest. Principal co-ordinates analysis (PCoA) showed that the community structure of ammonia-oxidizing archaea responded significantly to different vegetations, and the community structure of nitrogen-related microbes showed the most difference in coniferous forest. In addition, distance-based redundancy analysis (db-RDA) showed that the community structure of nitrogen-related microbes was mainly shaped by dissolved organic carbon ($P < 0.001$), available nitrogen ($P < 0.002$), and soil water content ($P < 0.001$). ④ Soil-denitrifying enzyme activity was mainly affected by the abundance of *nirS*-denitrifiers, ammonia-oxidizing archaea, and the community structure of nitrogen-related microbes, whereas nitrifying potential was only controlled by the abundance of ammonia-oxidizing archaea. Above all, subtropical forest vegetation significantly affects the abundance and community structure of soil nitrogen-related microbes, thereby changing their function of controlling the soil nitrogen cycle. This study can provide basic data for the coupling mechanism between soil microbes and N₂O release in subtropical forests in China.

Key words: subtropical forest; vegetations; nitrogen-related enzyme activity; nitrogen-related microbes; community structure

收稿日期: 2019-10-31; 修订日期: 2019-12-17

基金项目: 重庆市博士研究生科研创新项目(CYB19106)

作者简介: 王莹燕(1991~),女,博士研究生,主要研究方向为土壤微生物生态,E-mail:398766403@qq.com

* 通信作者,E-mail:gaoming@swu.edu.cn

氧化亚氮(N_2O)是地球大气中仅次于二氧化碳和甲烷的第3大温室气体,对全球变暖的直接贡献率约占6%^[1].过去普遍认为,农业和潮湿热带土是大气中 N_2O 的主要来源^[2].但近期研究表明:1992~2015年间全球森林生态系统 N_2O 排放总量年均值已达 $(3.62 \pm 0.16) \text{ Tg} \cdot \text{a}^{-1}$ ^[3].除了已知17%的热带森林土壤对其有较大贡献外^[4],由于气温升高和大气氮沉降加剧,高纬度森林和苔原等自然生态系统也开始大量排放 N_2O ^[5,6].

森林土壤 N_2O 主要来源于土壤氮素的氧化还原反应,其中硝化和反硝化是最关键的过程^[7].已有的研究表明,硝化和反硝化作用都与 N_2O 的释放存在显著的相关性^[8,9].它们的活性可以作为 N_2O 的释放量的宏量指标^[10].携带 *amoA* 基因的氨氧化古菌 (archaeal ammonium-oxidizers, AOA) 和氨氧化细菌 (bacterial ammonium-oxidizers, AOB) 是驱动硝化作用中限速和中心步骤-氨氧化过程的最重要微生物群^[11].反硝化作用所包含的亚硝酸盐还原酶 (*nirS* 基因编码的细胞色素 *cd1* 和 *nirK* 基因编码的含铜酶) 将亚硝酸盐 (NO_2^-) 还原为一氧化氮 (NO), 还有氧化亚氮还原酶编码基因 (*nosZ*) 将 N_2O 还原为 N_2 ^[12~14].硝化和反硝化细菌对土壤含水量、铵态氮 (NH_4^+) 和可溶性有机碳 (DOC) 浓度的变化都很敏感^[11].比如,氨氧化菌生长缓慢且属于兼性营养型,他们具有适应极端环境的能力,特别是 AOA^[14,15].相反地,反硝化细菌多属于异养厌氧型,它们需要高底物和含水量的生存环境^[11,16].因为硝化细菌和反硝化细菌间存在明显不同的环境偏好,所以不同环境条件下,支配土壤 N_2O 释放的微生物群落同样有很大的差异.已有研究表明,在中度湿润、寒冷和 NH_4^+ 富集的北方森林土壤中,氨氧化群落调控着土壤 N_2O 的排放^[17].与之相对,在水分饱和、严格厌氧环境且 NO_3^- 相对富集的亚热带-热带森林土壤,反硝化细菌主导着 N_2O 产生的过程^[18].但是对于某种森林生态系统中,不同植被下土壤微生物调控的硝化作用和反硝化作用的变化仍不得而知.

缙云山国家森林公园位于重庆市北部,属典型的北亚热带温暖湿润季风气候,该地区植物种类繁多,素有“川东小峨眉”之称.目前,对于该地区土壤的研究多集中于植被变化对土壤理化性质的影响^[19,20],以及土壤微生物群落的变化^[21~23].对亚热带森林土壤 N_2O 产生的微生物学机制缺乏系统性研究.而森林植被变化对微生物调控的氮循环的影响就更知之甚少.本文运用多种分子技术(末端限制性片段多态性分析,荧光定量 PCR 技术)对该区域

典型植被类型(针叶林、常绿阔叶林、毛竹林、针-阔混交林、草地)表层土壤亚硝酸盐还原酶基因 (*nirS*)、氧化亚氮还原酶基因 (*nosZ*) 还有氨氧化基因 (*amoA*) 微生物群落结构和丰度进行定性及定量的分析,并结合其相关功能,探究土壤功能微生物群落与 N_2O 排放的耦合机制,以期为亚热带森林生态系统氮循环提供基础数据.

1 材料与方法

1.1 研究区概况

缙云山国家森林公园位于重庆市北碚区境内 ($106^\circ 17' 43'' \sim 106^\circ 24' 50'' \text{E}$, $29^\circ 41' 08'' \sim 29^\circ 52' 03'' \text{N}$); 面积 $7\,600 \text{ hm}^2$; 平均海拔 951.5 m ; 相对高差 600 m , 以下简称缙云山. 属典型的北亚热带温暖湿润季风气候. 年均气温 13.6°C , 年均降水量 $1\,612 \text{ mm}$, 年均日照 $1\,293.9 \text{ h}$, 年平均蒸发量 777 mm . 缙云山植被类型多样, 有高等植物 244 科、 973 属和 $1\,861$ 种. 土壤为三叠纪须家河砂岩发育的酸性黄壤 ($\text{pH} 4.0 \sim 4.5$).

1.2 样品采集与测定方法

2016年5月下旬选取马尾松针叶林(针叶林, coniferous forest)、壳斗科阔叶林(阔叶林, broadleaved-leaved forest)、马尾松针叶-壳斗科阔叶混交林(针-阔混交林, mixed broadleaf-conifer forest)、毛竹林 (*P. pubescens* forest) 以及草地 (grassland) 土壤为研究对象, 每种植被类型土壤选择3个取样点, 在 $0 \sim 20 \text{ cm}$ 土层深度取样, 按四分法进行混匀, 分别取 1 kg 混后土样, 得到3等份样品, 用无菌 PET 树脂袋封装, 放于冰盒中带回实验室. 取 50 g 土样于 -20°C 冰箱保存以备分子实验分析, 其余部分用于理化性质分析. 采样点的详细情况见王莹燕等的研究^[23].

理化分析土样在室温下自然风干, 然后研磨过筛 (2 、 1 和 0.25 mm), 基本理化性质 pH 、全氮 (total nitrogen, TN)、全磷 (total phosphorous, TP)、全钾 (total potassium, TP)、有效氮 (available nitrogen, AN)、有效磷 (available phosphorous, AP)、速效钾 (available potassium, AK)、可溶性有机碳 (dissolve organic carbon, DOC) 和含水量 (water content, WC) 采用文献^[24]的方法进行分析. 土壤基本理化性质见表1.

1.3 硝化势和反硝化酶活的测定

土壤硝化势 (nitrifying potential, NP) 采用好气培养法进行测定^[25]. 稍作修改, 具体步骤如下: 预培养, 每个样品称取干土 100 g (过筛 2 mm), 置于培养皿中, 加入去离子水至水分含量为 25% , 放入培养

表 1 土壤基本理化性质¹⁾

Table 1 Basic physical and chemical properties of soil

样点	pH	TN /g·kg ⁻¹	TP /g·kg ⁻¹	TK /g·kg ⁻¹	AN /mg·kg ⁻¹	AP /mg·kg ⁻¹	AK /mg·kg ⁻¹	DOC /mg·kg ⁻¹	WC /g·kg ⁻¹
针叶林	4.02 ± 0.02c	0.67 ± 0.00c	0.10 ± 0.01c	13.36 ± 0.13b	36.82 ± 0.67d	1.69 ± 0.19c	28.50 ± 0.00d	8.33 ± 1.57c	150.16 ± 9.67c
阔叶林	4.12 ± 0.03bc	1.73 ± 0.00b	0.23 ± 0.02a	18.71 ± 2.26ab	157.67 ± 0.33b	5.45 ± 0.05b	58.00 ± 0.50c	22.51 ± 7.09ab	420.23 ± 9.75a
针-阔混交林	4.37 ± 0.02b	0.64 ± 0.00c	0.13 ± 0.00c	21.60 ± 0.61a	52.56 ± 1.67c	1.41 ± 0.00c	64.00 ± 1.50b	15.51 ± 2.01bc	197.85 ± 9.27bc
竹林	4.18 ± 0.02bc	1.90 ± 0.06a	0.15 ± 0.01b	24.97 ± 1.03a	206.88 ± 2.68a	9.76 ± 0.46a	81.50 ± 2.01a	27.50 ± 4.03a	241.62 ± 3.02b
草地	4.95 ± 0.03a	0.75 ± 0.01c	0.14 ± 0.01b	16.67 ± 0.7ab	83.45 ± 0.6bc	5.06 ± 0.03b	50.00 ± 1.0c	14.69 ± 1.42bc	252.90 ± 4.51b

1) 数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误, 同列数据后不同字母表示不同样点间差异达 5% 显著水平

箱中 25℃ 预培养 7 d, 使其基本恢复田间状态. 培养结束后, 测定土壤含水量. 培养, 称取预培养土壤 15 g 置于 250 mL 三角瓶中, 加入 (NH₄)₂SO₄ 调节 NH₄⁺-N 的浓度到 40 mg·(100 g)⁻¹, 按干土的质量计算, 田间持水量调节到 60%, 不加 (NH₄)₂SO₄ 溶液的作为对照. 将三角瓶放到 23℃ 的黑暗培养箱中培养 48 h. 培养结束之后, 土壤 NO₃⁻-N 含量的测定以 2 mol·L⁻¹ KCl 溶液振荡浸提过滤, 用紫外分光光度法测定.

土壤反硝化酶活 (denitrification enzyme activity, DEA) 采用硝态氮剩余量法进行测定^[26]. 稍作修改, 具体步骤如下: 称取风干土 1 g (过筛 1 mm) 置于 50 mL 三角瓶. 加入 10 mL 底物溶液 (100 mg·L⁻¹ 葡萄糖溶液 + 100 mg·L⁻¹ 硝酸钾溶液). 用塑料薄膜封口, 置于 37℃ 恒温培养箱培养 48 h 后, 4 000 r·min⁻¹ 离心 20 min. 用紫外分光光度法测量硝态氮含量 (*D*) 值.

1.4 土壤总 DNA 提取

利用 Fast DNA spin kit for soil 试剂盒 (MP BIO, Inc., Irvine, CA, USA) 根据制造商提供的说明进行提取. 洗脱后总 DNA 体积为 50 μL. 利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳确认总 DNA 的提取质量 (电泳条带的单一性), 同时用 NanoDrop ND-1000 微光分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, USA) 测定浓度.

1.5 荧光定量 PCR

利用荧光定量 PCR 技术定量分析涉氮功能基因丰度^[27], 具体步骤如下.

标准样品的制作: 选用荧光定量 PCR 引物扩增 *nirS* (*nirScd3aF/R3cd*)^[28,29]、*amoA* 古菌 (Arch-*amoAF*、Arch-*amoAR*)^[30] 和 *nosZ* (*nosZF*、*nosZ1622*)^[29,31] 基因片段, 对扩增产物进行纯化 (Universal DNA Purification Kit, TIANGEN) 并利用克隆技术获得单克隆子. 将测序成功的阳性克隆子提取菌液质粒 DNA (TIANprep Mini Plasmid Kit, TIANGEN), 用 NanoDrop ND-1000 微光分光光度计测定质粒 DNA 浓度并计算拷贝数, 以 10 倍为间隔系列稀释成荧光定量 PCR 标准品.

样品测定: 将样品与标准品同时进行 qPCR 检测, 包括阴性对照在内每个样品设 3 个重复. 反应体系为: ABI Prover SybrGreen qPCR Master Mix (ABI, USA) 10 μL, *nirS*、*nosZ* 和 *amoA* 的 DNA 模板分别为 5、5 和 2 μL, 引物各 1、1 和 0.5 μL (10 pmol·μL⁻¹), 加 ddH₂O 至终体积 20 μL. 每个循环中荧光收集在 83℃ 下进行. 荧光定量 PCR 分析由 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 系统进行.

1.6 末端限制性片段多态性分析

末端限制性片段多态性分析 (terminal restriction fragment length polymorphism analysis, T-RFLP)^[32] 具体步骤如下.

基因片段的扩增: 选用正向引物 5' 端带荧光物质 FAM 标记的引物扩增 *nirS* (*nirScd3aF*、*nirSR3cd*)、*amoA* (Arch-*amoAF*、Arch-*amoAR*) 和 *nosZ* (*nosZF*、*nosZ1622*) 基因片段. 扩增体系为 50 μL, 后扩增产物的纯化和浓度测定同 1.5 节.

产物酶切: 采用限制性内切酶 *MspI*、*HhaI* 和 *MspI* (Thermo Fisher scientific Inc., USA) 分别对 *nirS*、*amoA* 和 *nosZ* 基因的纯化 DNA 进行酶切, 根据制造商提供的说明进行酶切. 随后将酶切产物送至生工生物工程有限公司 (上海) 进行毛细管电泳测序并输出末端限制性片段 (terminal restriction fragments, T-RFs) 图谱^[33].

1.7 数据分析

土壤理化性质、微生物拷贝数的 one-way ANOVA 单因素方差分析 (LSD 和 Duncan 分析) 和皮尔逊相关分析利用 SPSS 21.0 处理. 基于 T-RFLP 数据, 群落结构 α-多样性指数分析, 即丰富度指数 (richness, *S*)、均匀度指数 (evenness, *J'*)、香农-威尔指数 (shannon-weiner index, *H'*) 以及群落结构堆积图, 均利用 Excel 2016 完成; 利用 CANOCO 软件对土壤环境因子和微生物群落结构进行基于距离尺度的冗余分析 (distance-based redundancy analysis, db-RDA), 并运用蒙特卡罗置换检验 (Monte Carlo permutation test) 去检验约束排序模型的显著性 (用

F 值作为统计量).

2 结果与分析

2.1 不同森林植被土壤硝化势和反硝化酶活特征

由图 1 可知,森林土壤反硝化酶活显著高于硝化势,是其 20~160 倍,且各森林植被土壤间涉氮酶活均呈现显著差异($P < 0.05$,图 1).草地土壤反硝化酶活最高,阔叶林土壤硝化势最高,而针叶林土壤中 2 种酶活均是最低值.皮尔逊相关分析表明:森林土壤 DEA 与土壤 pH、DOC、WC、TP 和 AK 呈显著正相关;而 NP 与土壤 DOC、WC、TN、TP 和 AN 显著正相关($P < 0.05$),其中 WC 和 TP 达极显著水平($P < 0.01$),见表 2.

图中字母表示硝化势和反硝化酶活在不同植被土壤中的差异性($P < 0.05$),折线下方字母代表硝化势;柱上字母代表反硝化酶活

图 1 不同森林植被下土壤硝化势和反硝化酶活的含量
Fig. 1 Nitrification potential and denitrification enzyme activity in forest soil relative to vegetation

表 2 硝化作用、反硝化作用与土壤理化性质的相关关系¹⁾

Table 2 Correlation between nitrification, denitrification, and soil physicochemical properties

项目	pH	DOC	WC	TN	TP	TK	AN	AP	AK
DEA	0.582 *	0.542 *	0.615 *	0.274	0.605 *	0.512	0.389	0.336	0.621 *
NP	-0.111	0.552 *	0.657 **	0.618 *	0.662 **	0.246	0.587 *	0.479	0.331

1) * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$

2.2 不同森林植被土壤产 N₂O 功能基因群落丰度特征

不同森林植被土壤中涉氮功能基因的拷贝数变化情况如图 2.在竹林土壤中涉氮功能基因的拷贝数显著高于其他森林植被土壤($P < 0.05$),而针叶林土壤最低.除了 *nirS* 基因, *amoA* 和 *nosZ* 基因的拷贝数在不同森林植被土壤间均表现出显著差异性($P < 0.05$).涉氮功能基因与土壤理化性质的相关性,见表 3.其中,DOC、TN、TK、AN 以及 AK 均与 3 种涉氮功能基因拷贝数达到极显著水平($P < 0.01$).此外, *amoA* 基因与 TP 极显著正相关($P < 0.01$),与 WC 和 AP 显著正相关($P < 0.05$). *nosZ* 基因与 AP 同样呈现显著正相关($P < 0.05$).与此同时,涉氮功能基因的拷贝数与反硝化酶活和硝化势的相关性分析显示: *amoA* 基因拷贝数与 DEA ($P < 0.05$, $r = 0.616$) 和 NP ($P < 0.01$, $r = 0.713$) 均存在显著相关性; *nirS* 基因拷贝数与 DEA 呈显著正相关($P < 0.05$, $r = 0.578$); *nosZ* 基因拷贝数与 2 种土壤

酶活均不存在相关性.

图中小写字母表示不同涉氮功能基因拷贝数在不同植被土壤中的差异性($P < 0.05$),大写字母表示总涉氮功能基因拷贝数在不同植被土壤中的差异性($P < 0.05$)

图 2 不同森林植被下土壤涉氮功能基因拷贝数的变化
Fig. 2 Variation in the copy number of nitrogen-involved functional genes in forest soil relative to vegetation

表 3 涉氮功能基因拷贝数与土壤理化性质的相关关系¹⁾

Table 3 Correlation between the copy numbers of N functional genes and soil physicochemical properties

项目	pH	DOC	WC	TN	TP	TK	AN	AP	AK
$q(nirS)$	0.125	0.895 **	0.279	0.686 **	0.330	0.916 **	0.814 **	0.826 **	0.953 **
$q(amoA)$	-0.244	0.884 **	0.634 *	0.759 **	0.719 **	0.833 **	0.752 **	0.534 *	0.860 **
$q(nosZ)$	-0.488	0.868 **	0.323	0.797 **	0.432	0.878 **	0.784 **	0.617 *	0.851 **

1) * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$

2.3 不同植被土壤产 N₂O 功能基因群落结构特征

基于 T-RFLP 的群落结构数据, 利用 α -多样性的多个特征值(香农-威尔多样性指数、丰富度指数和均匀度指数)表征不同森林植被土壤涉氮功能基因群落结构多样性, 见表 4。就香农-威尔多样性指数而言, 森林土壤 *nirS* 基因数值明显高于其他 2 个基因; 阔叶林土壤 3 种基因均为最高。对于丰富度指数, 森林土壤 *nirS* 基因数值明显低于其他 2 个基因; 不同森林植被

3 个涉氮功能基因的丰富度指数间差异不显著。均匀度指数, *nirS* 基因的数值同样高于其他 2 个基因, *nirS* 在不同森林植被间存在一定显著差异。3 个涉氮功能基因的特征值与 DEA 和 NP 之间的相关分析显示, DEA 与所有特征值均不存在相关性; NP 与 *amoA* 和 *nosZ* 基因的特征值显著相关, 其中 *amoA* 基因丰富度指数和 *nosZ* 基因的香农-威尔多样性指数达到极显著水平($P < 0.01$, r 为 0.712 和 0.652)。

表 4 不同森林植被土壤涉氮功能微生物的群落特征值¹⁾

Table 4 Characteristics of nitrogen-related microbial community structure in forest soil relative to vegetation

样点	香农-威尔多样性指数			丰富度指数			均匀度指数		
	<i>nirS</i>	<i>amoA</i>	<i>nosZ</i>	<i>nirS</i>	<i>amoA</i>	<i>nosZ</i>	<i>nirS</i>	<i>amoA</i>	<i>nosZ</i>
针叶林	2.08 ± 0.12b	1.06 ± 0.24b	1.44 ± 0.05b	1.34 ± 0.17b	3.43 ± 1.09b	3.93 ± 1.13a	0.92 ± 0.01a	0.31 ± 0.03b	0.42 ± 0.01b
阔叶林	2.47 ± 0.05a	1.73 ± 0.02a	1.64 ± 0.00a	2.15 ± 0.12a	7.38 ± 0.42a	3.52 ± 0.17a	0.87 ± 0.00b	0.39 ± 0.00a	0.45 ± 0.01a
针-阔混交林	1.68 ± 0.19c	1.56 ± 0.02a	1.00 ± 0.03c	1.40 ± 0.31b	4.64 ± 0.32b	3.87 ± 0.13a	0.68 ± 0.02c	0.4 ± 0.00a	0.27 ± 0.01c
竹林	0.84 ± 0.04d	1.63 ± 0.04a	1.53 ± 0.04ab	1.09 ± 0.07b	8.60 ± 1.00a	4.05 ± 0.27a	0.36 ± 0.01d	0.4 ± 0.00a	0.42 ± 0.00b
草地	2.02 ± 0.06bc	1.01 ± 0.04b	1.00 ± 0.04c	2.08 ± 0.06a	3.06 ± 0.28b	2.88 ± 0.14a	0.66 ± 0.01c	0.28 ± 0.01b	0.30 ± 0.02c

1) 数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误, 同列数据后不同字母表示不同样点间差异达 5% 显著水平

基于 T-RFs 片段丰度的群落结构数据, 不同森林植被土壤中涉氮功能微生物的群落组成, 由图 3 可知, 其中每一个 T-RFs 片段代表一种微生物种群。在 3 个涉氮功能微生物群落组成中, *nirS* 微生物群落组成最为丰富, 进一步证明了其最高的香农-威尔多样性指数。阔叶林土壤中涉氮功能微生物组成最为丰富。不同森林植被下, 各涉氮功能微生物都有其独有的优势种群。

2.4 不同植被土壤涉氮功能基因群落结构与土壤理化性质的关系

由图 4 可知, 在针叶林土壤中 3 个涉氮功能微生物的群落样点分布均与其他森林植被土壤样点相距较远, 即针叶林土壤中的涉氮微生物群落结构较

为独特。就 *nirS* 和 *amoA* 微生物而言, 阔叶林与针-阔混交林的群落结构较为相似; 而 *nosZ* 微生物, 针-阔混交林却与草地土壤中的群落结构相似。此外, 涉氮功能微生物的群落结构与土壤理化性质和酶活的关系, 见表 5。每个箭头代表其与群落结构的正负关系, 其长度代表对群落结构影响的大小。其中, 涉氮功能微生物群落结构均是由多个土壤理化调控, DOC、AN 和 WC 同时调控多个涉氮功能微生物群落结构。由表 5 可知, 在 *nirS* 和 *amoA* 微生物群落结构中, DOC 是最主要的群落结构的环境调控因子; 而 *nosZ* 微生物群落结构是 AN, 此外, *amoA* 和 *nosZ* 微生物群落结构与 DEA 有显著的相关性, 而与 NP 的相关性不够显著。

表 5 不同森林植被土壤涉氮功能微生物群落结构与土壤理化性质的相关性¹⁾

Table 5 Correlation between nitrogen-related microbial community structure and soil properties in forest soil relative to vegetation

理化性质	<i>nirS</i>			<i>amoA</i>			<i>nosZ</i>		
	解释度/%	F	P	解释度/%	F	P	解释度/%	F	P
pH	19.5	9.9	0.002	—	—	—	—	—	—
WC	—	—	—	<0.1	0.8	0.41	34.4	32.8	0.002
DOC	27.2	7.9	0.002	29.6	66.8	0.001	0.3	6.4	0.004
TN	—	—	—	—	—	—	11.1	80.0	0.006
TP	—	—	—	19.8	6.9	0.01	—	—	—
TK	—	—	—	45.7	11.0	0.002	—	V	—
AN	12.3	13.1	0.002	—	—	—	0.8	10.6	0.002
AP	36.0	6.0	0.004	—	—	—	—	—	—
AK	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DEA	0.4	0.4	0.718	4.0	51.0	0.001	53.0	14.7	0.002
NP	0.6	1.2	0.34	<0.1	0.2	0.908	<0.1	0.4	0.902

1) “—”表示文章中该理化性质对微生物群落结构没有显著影响

Fig. 3 Accumulation diagram of nitrogen-related microbial community structure in forest soil relative to vegetation

3 讨论

3.1 不同森林植被对土壤硝化势、反硝化活性的影响

硝化作用和反硝化作用是土壤氮循环过程中微

生物介导的关键过程,它们调控着 N_2O 从土壤中的排出量^[34].本文研究显示:缙云山森林地区土壤中,反硝化酶活显著高于硝化势,是主导土壤 N_2O 排放的主要过程.该结果与 Zhang 等^[18]在亚热带森林土

图4 不同森林植被土壤涉氮功能微生物群落的基于距离的冗余分析排序

Fig. 4 Distance-based redundancy analysis of the soil microbial community structure in forest soil relative to vegetation

多为湿润饱和土壤^[35],土壤团聚体在水体饱和的情况下,形成微型的厌氧环境为反硝化微生物提供了最佳的生长环境^[36].此外,有研究表明水分含量影响着土壤氧化能力进而增加了反硝化活性^[37].在本文中同样证明了水含量在亚热带森林土壤中调控氮循环过程起到关键作用^[38].除此之外,DOC在森林土壤氮循环过程中也起着关键作用. Xu等^[39]在湿润亚热带森林土的研究表明,DOC是反硝化作用的关键因子.而 Mørkved等^[40]的研究也表明DOC对森林土壤硝化反应有显著影响.在不同植被类型下,针叶林的反硝化活性和硝化势均被证明处于较低的水平^[32,41],而阔叶林的硝化作用处在一个较高的水平^[41].Huang等^[42]的研究指出,土壤表面植物残余物C/N比越高,土壤N₂O释放的通量越低.而亚热带森林里凋落的针叶的C/N远高于阔叶^[44].这或许能解释为何针叶林的硝化作用和反硝化作用相比其他森林类型低.但本文未检测各森林植被落叶的C/N,所以不能确认缙云山针叶林土壤也是因为这个原因.

3.2 不同森林植被对土壤产N₂O功能微生物丰度的影响

涉氮功能微生物的qPCR检测能定量某类微生物的潜在数量,用基因拷贝数来表征^[24].本文中,调控亚硝酸盐还原酶的基因包括 *nirS* 和 *nirK* 基因,调控氨氧化过程的 *amoA* 基因也包括氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB).但是,本文中笔者未扩增出 *nirK* 基因和 AOB.在中国亚热带森林地区已有研究显示,未在森林土壤中检测到 AOB,但 AOA 的基因拷贝数却很高^[44,45].有研究表明:氨单加氧酶对氨的依赖是主要原因,因为在低 pH (< 4) 土壤中氨的有效性很低^[15].但是,对于为何检测不出 *nirK* 基因,至今没有找到合理的原因.虽然在温带森林土壤中出现过检测不出 *nirS* 基因的情况,归因于 pH 过低和引物的偏好性问题^[46].本文中,针叶林植被土壤中涉氮功能基因拷贝数总量最低.对于这现象的解释可能是:针叶林的凋落分解速率较慢,土壤可获得的营养较少,土壤有机碳含量也较低,造成微生物总量低进而涉氮功能微生物也低^[47].在典型亚热带森林植被土壤的研究中发现:竹林的 *amoA* 拷贝数明显高于阔叶林和针叶林^[48].但目前没有文献记载,森林植被间反硝化功能基因拷贝数的差异.涉氮功能基因与土壤理化性质的相关性分析显示,3个功能基因拷贝数与碳、氮和钾有明显的相关性^[49,50].此外, *amoA* 基因拷贝数还与水分含量和磷有显著相关性,是因为 AOA 对厌氧环境的敏感性高^[51].

壤中所得研究结果一致,因为天然亚热带森林地区

3.3 不同森林植被对土壤产 N_2O 功能微生物群落结构的影响

微生物群落结构多样性确定其在某种生态环境里的稳定性. 本文研究发现: *nirS* 反硝化菌群落结构多样性明显高于 AOA 和 *nosZ* 反硝化菌群落结构, 该结果与罗蓉在温带人工林中得到的结果一致. 但其他生态系统中 *nirS* 反硝化菌群落结构并没有表现出明显的差异^[45,51,52]. 阔叶林植被土壤涉氮微生物群落结构多样性指数均高于其他植被^[48]. 本文中阔叶林为壳斗科阔叶林多为常绿或落叶乔木, 已有的研究表明: 亚热带常绿阔叶林在水热条件搭配最佳的时段大量换叶^[53], 落叶腐化分解为土壤微生物提供了大量的 C、N 来源以及充足的水分. 同时, 从本文 db-RDA 分析显示出 DOC、AN 和 WC 对涉氮功能微生物群落结构显著正相关^[16,50,51], 这就合理地解释了为何阔叶林植被土壤中涉氮功能微生物的多样性明显高于其他植被. 从 PCoA 分析看出, 针叶林植被土壤涉氮功能微生物表现出明显的特异性. 结合针叶林的土壤理化性质, 针叶林土壤是一个高酸低营养的微环境, 对微生物生存就异常严苛, 多为自养的固氮菌^[54]. 在王莹燕等^[23]对缙云山不同林分下微生物的研究已经发现针叶林下微生物种类少, 且群落结构特异性明显, 所以在此基础上涉氮微生物表现出的特异性也是可信的.

3.4 土壤氮相关酶活与产 N_2O 微生物之间的交互关系

土壤中氮循环是一系列由涉氮功能微生物介导的酶促反应, 所以涉氮反应的酶活性与微生物的丰度和群落结构有着复杂的联系. 本文显示: 硝化势和反硝化酶活均与 AOA 的丰度相关. 已有研究表明, 在中国亚热带森林地区, 相较于 AOB, AOA 是调控土壤硝化作用的主要菌群^[44]. 而后, Jie 等^[45]研究亚热带森林土壤涉氮功能微生物得到 AOA 对整个氮循环有关键作用, 不止硝化作用. 从已有研究可知: 氨氧化过程由 *amoA* 微生物调控将 NH_4^+ 转化成 NO_3^- , 其中 NO_3^- 作为反硝化作用的初始底物被反硝化微生物利用^[55], 所以 AOA 的丰度与硝化与反硝化过程显著相关是可信的. 目前, *nirS* 和 *nosZ* 反硝化菌的丰度与反硝化活性间的显著相关性有着迥然不同的结论^[56~58], 笔者认为会出现这样的差异与特定生态环境有显著的关系. 而对于亚热带森林地区反硝化作用与反硝化功能微生物群落结构的相关性仍没有具体定论. 虽然, 在已有研究中发现硝化或反硝化与涉氮微生物的群落结构没有相关性^[58,59], 但本文中反硝化作用却与 2 个涉氮功能基因有显著相关性. 从本文的群落结构堆积图中可见, 在不同的植

被类型下各涉氮功能基因均有不同的优势种群, 当优势种群发生显著变化时很可能影响整个群落结构. 笔者推测在植被的差异导致土壤中调控反硝化作用的优势种群变化显著, 进而造成群落结构与反硝化的显著相关性. 为了进一步确认以上猜想, 在未来的工作中笔者将采用更先进的分子技术找到具体调控反硝化作用的涉氮功能微生物的种群.

4 结论

缙云山亚热带森林地区, 各森林植被类型土壤中硝化势和反硝化酶活均表现出显著的差异 ($P < 0.05$), 且反硝化酶活显著高于硝化势. 此外, 土壤 DOC、WC 和 TP 是影响反硝化酶活和硝化势的主要环境因子. 土壤反硝化酶活主要受 *nirS* 反硝化菌和 AOA 的丰度, 还有 AOA 和 *nosZ* 反硝化菌群落结构的影响; 而硝化势主要是由 AOA 的丰度调控. 在 5 种植被类型间, 针叶林土壤反硝化酶活和硝化势均最低, 3 种涉氮功能微生物的丰度最低且群落结构最为独特, 或许针叶林类型是有效控制土壤 N_2O 释放的亚热带植被类型. 由上可知: 亚热带森林植被类型能显著影响土壤涉氮功能微生物的丰度和群落结构, 进而改变其调控土壤氮素循环的功能. 本研究可为我国亚热带森林土壤氮转化的微生物学机制提供基础数据, 对研究土壤氮动态具有重要的生态学意义.

参考文献:

- [1] Lewis P. Climate change 2007: The physical science basis [J]. South African Geographical Journal Being A Record of the Proceedings of the South African Geographical Society, 2007, **92** (1): 86-87.
- [2] Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Guidelines for national greenhouse gas inventories [C]. Agriculture, Nitrous Oxide from Agricultural Soils and Manure Management. Paris, France: OECD, 1997.
- [3] 张克柔. 全球森林和草地自然生态系统氧化亚氮排放的模型构建与模拟 [D]. 西安: 西北农林科技大学, 2018.
Zhang K R. Model incorporation and simulation for nitrous oxide emissions from global forests and grasslands [D]. Xi'an: Northwest A&F University, 2018.
- [4] Koehler B, Corre M D, Veldkamp E, et al. Immediate and long-term nitrogen oxide emissions from tropical forest soils exposed to elevated nitrogen input [J]. Global Change Biology, 2010, **15** (8): 2049-2066.
- [5] Elberling B, Christiansen H H, Hansen B U. Erratum: high nitrous oxide production from thawing permafrost [J]. Nature Geoscience, 2010, **3**(5): 506.
- [6] Repo M E, Susiluoto S, Lind S E, et al. Large N_2O emissions from cryoturbated peat soil in tundra [J]. Nature Geoscience, 2009, **2**(3): 189-192.
- [7] Barnard R, Leadley P W, Hungate B A. Global change, nitrification, and denitrification: A review [J]. Global Biogeochemical Cycles, 2005, **19**(1): GB1007.

- [8] Parton W J, Mosier A R, Ojima D S, *et al.* Generalized model for N₂ and N₂O production from nitrification and denitrification [J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 1996, **10**(3): 401-412.
- [9] 徐婷婷, 郑俊强, 韩士杰, 等. 长白山阔叶红松林土壤氮转化过程对长期施氮和降水变化的响应[J]. *应用生态学报*, 2018, **29**(9): 2797-2807.
- Xu T T, Zheng J Q, Han S J, *et al.* Responses of soil nitrogen transformation to long-term nitrogen fertilization and precipitation changes in a broad-leaved Korean pine forest in Changbai Mountains, China [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, **29**(9): 2797-2807.
- [10] 方华军, 程淑兰, 于贵瑞, 等. 森林土壤氧化亚氮排放对大气氮沉降增加的响应研究进展[J]. *土壤学报*, 2015, **52**(2): 16-25.
- Fang H J, Cheng S L, Yu G R, *et al.* Study on responses of nitrous oxide emission to increased nitrogen deposition in forest soils: a review[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2015, **52**(2): 16-25.
- [11] Levy-Booth D J, Prescott C E, Grayston S J. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, **75**: 11-25.
- [12] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, **61**(4): 533-616.
- [13] Petersen D G, Blazewicz S J, Firestone M, *et al.* Abundance of microbial genes associated with nitrogen cycling as indices of biogeochemical process rates across a vegetation gradient in Alaska [J]. *Environmental Microbiology*, 2012, **14**(4): 993-1008.
- [14] Rasche F, Knapp D, Kaiser C, *et al.* Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest [J]. *ISME Journal*, 2010, **5**(3): 389-402.
- [15] Fujitani H, Kumagai A, Ushiki N, *et al.* Selective isolation of ammonia-oxidizing bacteria from autotrophic nitrifying granules by applying cell-sorting and sub-culturing of microcolonies [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, **6**: 1159.
- [16] Szukics U, Abell G, Hödl V, *et al.* Nitrifiers and denitrifiers respond rapidly to changed moisture and increasing temperature in a pristine forest soil [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, **72**(3): 395-406.
- [17] Morishita T, Aizawa S, Yoshinaga S, *et al.* Seasonal change in N₂O flux from forest soils in a forest catchment in Japan [J]. *Journal of Forest Research*, 2011, **16**(5): 386-393.
- [18] Zhang J B, Cai Z C, Zhu T B. N₂O production pathways in the subtropical acid forest soils in China [J]. *Environmental Research*, 2011, **111**(5): 643-649.
- [19] 李鉴霖, 江长胜, 郝庆菊. 缙云山不同土地利用方式土壤有机碳组分特征[J]. *生态学报*, 2015, **35**(11): 3733-3742.
- Li J L, Jiang C S, Hao Q J. Distribution characteristics of soil organic carbon and its physical fractions under the different land uses in Jinyun Mountain [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, **35**(11): 3733-3742.
- [20] 王富华, 吕盛, 黄容, 等. 缙云山 4 种森林植被土壤团聚体有机碳分布特征[J]. *环境科学*, 2019, **40**(3): 1504-1511.
- Wang F H, Lv S, Huang R, *et al.* Distribution of organic carbon in soil aggregates from four kinds of forest vegetation on Jinyun Mountain [J]. *Environmental Science*, 2019, **40**(3): 1504-1511.
- [21] 李勇, 顾壹俊, 刘益军, 等. 缙云山森林土壤微生物数量与群落特征[J]. *植物营养与肥料学报*, 2012, **18**(5): 1161-1167.
- Li Y, Gu Y J, Liu Y J, *et al.* Characteristics of microbial quantities and communities in forest soils of Jinyun Mountain [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2012, **18**(5): 1161-1167.
- [22] 曾清苹, 何丙辉. 应用 PLFA 法分析氮沉降对缙云山马尾松林土壤微生物群落结构的影响 [J]. *环境科学*, 2016, **37**(9): 3590-3597.
- Zeng Q P, He B H. Effect of nitrogen deposition on soil microbial community structure determined with the PLFA method under the masson pine forest from Mt. Jinyun, Chongqing [J]. *Environmental Science*, 2016, **37**(9): 3590-3597.
- [23] 王莹燕, 王子芳, 黄容, 等. 缙云山不同森林植被下土壤微生物群落结构特征研究[J]. *土壤学报*, 2019, **56**(5): 1210-1220.
- Wang Y Y, Wang Z F, Huang R, *et al.* Characterization of soil microbial community structure as affected by vegetation in Jinyun Mountain [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, **56**(5): 1210-1220.
- [24] 鲍士旦. 土壤农化分析(第三版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [25] Chu H Y, Fujii T, Morimoto S, *et al.* Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(2): 485-491.
- [26] 和文祥, 魏燕燕, 蔡少华. 土壤反硝化酶活性测定方法及影响因素研究 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2006, **34**(1): 121-124.
- He W X, Wei Y Y, Cai S H. Study on assaying method and affecting factors of soil denitrification enzyme activity [J]. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Nation Science Edition)*, 2006, **34**(1): 121-124.
- [27] 张晶, 张惠文, 张成刚. 实时荧光定量 PCR 及其在微生物生态学中的应用 [J]. *生态学报*, 2005, **25**(6): 1445-1450.
- Zhang J, Zhang H W, Zhang C G. Real-time fluorescent quantitative PCR and its application in microbial ecology [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, **25**(6): 1445-1450.
- [28] Michotey V, Mejean V, Bonin P. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd1-denitrifying bacteria in environmental marine samples [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(4): 1564-1571.
- [29] Throback I N, Enwall K, Jarvis Å, *et al.* Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, **49**(3): 401-417.
- [30] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, *et al.* Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, **10**(6): 1601-1611.
- [31] Kloos K, Mergel A, Rösch C, *et al.* Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria [J]. *Functional Plant Biology*, 2001, **28**(9): 991-998.
- [32] 马万里, Tibbits J, Adams M. 土壤微生物多样性研究的新方法 [J]. *土壤学报*, 2004, **41**(1): 103-107.
- Ma W L, Tibbits J, Adams M. A new method for research on soil microbial diversity [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, **41**(1): 103-107.
- [33] 周永娜, 乔沙沙, 刘晋仙, 等. 庞泉沟自然保护区华北落叶松与桦树林土壤微生物群落结构 [J]. *应用与环境生物学报*, 2017, **23**(3): 520-526.

- Zhou Y N, Qiao S S, Liu J X, *et al.* Characteristics of the soil microbial community structures of *Betula platyphylla* and *Larix principis-rupprechtii* forests in the Pangquangou Reserve [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2017, **23** (3): 520-526.
- [34] Baral B R, Kuyper T W, Van Groenigen J W. Liebig's law of the minimum applied to a greenhouse gas: alleviation of P-limitation reduces soil N₂O emission[J]. Plant and Soil, 2014, **374** (1-2): 539-548.
- [35] 丁昌璞. 中国自然土壤、旱作土壤、水稻土的氧化还原状况和特点[J]. 土壤学报, 2008, **45**(1): 66-75.
- Ding C P. Oxidation-reduction regimes and characteristics of natural soil, upland soil and paddy soil in China [J]. Acta Pedologica Sinica, 2008, **45**(1): 66-75.
- [36] Renault P, Stengel P. Modeling oxygen diffusion in aggregated soils: I. anaerobiosis inside the aggregates [J]. Soil Science Society of America Journal, 1994, **58**(4): 1017-1023.
- [37] Zhang J B, Cai Z C, Cheng Y, *et al.* Denitrification and total nitrogen gas production from forest soils of Eastern China [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, **41** (12): 2551-2557.
- [38] 邓杰, 邓湘雯, 黄志宏, 等. 4种典型亚热带森林生态系统生长季地表N₂O通量特征[J]. 中国农学通报, 2012, **28** (13): 6-13.
- Deng J, Deng X W, Huang Z H, *et al.* Surface N₂O flux from 4 different typical forest stands in growing season in subtropical south China [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, **28**(13): 6-13.
- [39] Xu Y B, Cai Z C. Denitrification characteristics of subtropical soils in China affected by soil parent material and land use [J]. European Journal of Soil Science, 2007, **58**: 1293-1303.
- [40] Mørkved P T, Dörsch P, Bakken L R. The N₂O product ratio of nitrification and its dependence on long-term changes in soil pH [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, **39** (8): 2048-2057.
- [41] Ambus P, Zechmeister-Boltenstern S, Butterbach-Bahl K. Sources of nitrous oxide emitted from European forest soils [J]. Biogeosciences, 2006, **3**(2): 135-145.
- [42] Huang Y, Zou J W, Zheng X H, *et al.* Nitrous oxide emissions as influenced by amendment of plant residues with different C:N ratios [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, **36** (6): 973-981.
- [43] 周存宇, 周国逸, 王跃思, 等. 鼎湖山主要森林生态系统地表N₂O通量[J]. 中国环境科学, 2004, **24** (6): 688-691.
- Zhou Y C, Zhou G Y, Wang Y S, *et al.* The N₂O flux from soils of main forest ecosystems in Dinghushan [J]. China Environmental Science, 2004, **24** (6): 688-691.
- [44] Isobe K, Koba K, Suwa Y, *et al.* High abundance of ammonia-oxidizing archaea in acidified subtropical forest soils in southern China after long-term N deposition [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, **80**(1): 193-203.
- [45] Chen J, Xiao G L, Kuzyakov Y, *et al.* Soil nitrogen transformation responses to seasonal precipitation changes are regulated by changes in functional microbial abundance in a subtropical forest [J]. Biogeosciences, 2017, **14** (9): 2513-2525.
- [46] Katsuyama C, Kondo N, Suwa Y, *et al.* Denitrification activity and relevant bacteria revealed by nitrite reductase gene fragments in soil of temperate mixed forest [J]. Microbes and Environments, 2008, **23**(4): 337-345.
- [47] Bauhus J, Paré D, Côté L. Effects of tree species, stand age and soil type on soil microbial biomass and its activity in a southern boreal forest [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1998, **30** (8-9): 1077-1089.
- [48] 刘卜榕. 亚热带四种主要森林土壤氨氧化微生物群落结构及多样性研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2012.
- Liu B R. Community and diversity of ammonia-oxidizing microbes in four major type of forest in subtropics of China [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2012.
- [49] Bárta J, Melichová T, Vaněk D, *et al.* Effect of pH and dissolved organic matter on the abundance of *nirK* and *nirS* denitrifiers in spruce forest soil [J]. Biogeochemistry, 2010, **101** (1-3): 123-132.
- [50] Szukics U, Hackl E, Zechmeister-Boltenstern S, *et al.* Rapid and dissimilar response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to nitrogen and water amendment in two temperate forest soils [J]. Microbiological Research, 2012, **167** (2): 103-109.
- [51] Espenberg M, Truu M, Mander ü, *et al.* Differences in microbial community structure and nitrogen cycling in natural and drained tropical peatland soils [J]. Scientific Reports, 2018, **8**: 4742.
- [52] 李尚玮. 埋置白三叶对苹果园土壤硝化反硝化微生物多样性的影响研究[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2017.
- Li S W. Effects of buried white clover on nitrification and denitrification microbial diversity in apple orchard soil [D]. Xi'an: Northwest A&F University, 2017.
- [53] 温远光, 韦炳二, 黎清娟. 亚热带森林凋落物产量及动态的研究 [J]. 林业科学, 1989, **25** (6): 542-548.
- Wen Y G, Wei B E, Li J J. A study on the litter production and dynamics of subtropical forest [J]. Scientia Silvae Sinicae, 1989, **25** (6): 542-548.
- [54] 黄宝灵, 吴庆梅, 吕成群, 等. 几种松树根际共生菌的数量分析 [A]. 微生物实用技术生态环境应用学术研讨会论文集 [C]. 深圳: 中国林业与环境促进会, 2008.
- [55] Knowles R. Denitrification [J]. Microbiological Reviews, 1982, **46** (1): 43-70.
- [56] Tao R, Wakelin S A, Liang Y C, *et al.* Nitrous oxide emission and denitrifier communities in drip-irrigated calcareous soil as affected by chemical and organic fertilizers [J]. Science of the Total Environment, 2018, **612**: 739-749.
- [57] Dandie C E, Wertz S, Leclair C L, *et al.* Abundance, diversity and functional gene expression of denitrifier communities in adjacent riparian and agricultural zones [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, **77** (1): 69-82.
- [58] Chen Z, Hou H J, Zheng Y, *et al.* Influence of fertilisation regimes on a *nosZ*-containing denitrifying community in a rice paddy soil [M]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, **92**: 1064-1072.
- [59] Enwall K, Philippot L, Hallin S. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71** (12): 8335-8343.

CONTENTS

Comparison of Three Receptor Models for Source Apportionment of PM _{2.5} in Shanghai; Using Hourly Resolved PM _{2.5} Chemical Composition Data	ZHOU Min (1997)
Impact of Differences in the Concentrations of Ozone on the Chemical Composition of Single Particles	WU Meng-xi, CHENG Chun-lei, HUANG Bo, et al. (2006)
Influence of Secondary Organic Coating on Hygroscopicity of a Sodium Chloride Core; Based on Micro-scale Single Particle Analysis	ZHANG Shu-jia, XU Liang, GUO Xin-mei, et al. (2017)
Comparative Analysis of Pollution Characteristics of Carbonaceous Aerosol Components in the Atmosphere Between Urban and Suburban Areas	LI Xin-yue, ZHANG Kai-shan, DENG Lin-li, et al. (2026)
Distribution Characteristics and Source Apportionment of Elements Bonded with PM _{2.5} and PM ₁₀ in Linyi	LU Ping, ZHAO Xue-yan, YIN Bao-hui, et al. (2036)
Characteristics and Sources of Microbial Aerosols in Urban and Mountainous Areas in Autumn and Winter in Xi'an, China	XIE Wen-wen, LU Rui, MU Fei-fei, et al. (2044)
Pollution Characteristics of Cooking Fumes, Particulates, and Non-methane Hydrocarbons in the Exhaust of Typical Beijing Restaurants	HE Wan-qing, WANG Tian-yi, SHAO Xia, et al. (2050)
PM _{2.5} Concentration Influencing Factors in China Based on the Random Forest Model	XIA Xiao-sheng, CHEN Jing-jing, WANG Jia-jia, et al. (2057)
Spatio-temporal Variation of PM _{2.5} Related Relationships in China from the Perspective of Air Pollution Regional Linkage Control and Prevention	YANG Wen-tao, HUANG Hui-kun, WEI Dong-sheng, et al. (2066)
Characteristics of Spatial and Temporal Evolution and Investigation of Air Pollution in Guangdong-Hong Kong-Macao Greater Bay Area Based on Ground-Space Observation Data	WANG Yao-ting, LIANG Jia-cheng, ZHENG Zuo-fang, et al. (2075)
Hydrochemical Characteristics and Formation Causes of Ground Karst Water Systems in the Longzici Spring Catchment	TANG Chun-lei, ZHENG Xiu-qing, LIANG Yong-ping (2087)
Tempo-spatial and Retention Analysis of Total Phosphorus in the Three Gorges Reservoir	TANG Xiao-ya, TONG Si-chen, HUANG Guo-xian, et al. (2096)
Vertical Distribution Characteristics of Dissolved Oxygen and Chlorophyll a in Typical Tributaries During the Impoundment Period of the Three Gorges Reservoir	YANG Fan, JI Dao-bin, WANG Li-jing, et al. (2107)
Spatial-temporal Distribution of Nutrients in Hanfeng Lake After Official Operation	FU Shi, NI Jiu-pai, HE Bing-hui, et al. (2116)
Spatio-temporal Variations in the Characteristics of Water Eutrophication and Sediment Pollution in Baiyangdian Lake	LIU Xin, SHI Bin, MENG Jing, et al. (2127)
Spatial-temporal Distribution of Suspended Solids and Its Sedimentation Flux and Nutrients Effects in Xin'anjiang Reservoir, China	SHI Peng-cheng, ZHU Guang-wei, YANG Wen-bin, et al. (2137)
Bioavailability Characteristics of Chromophoric Dissolved Organic Matter in Lake Gaoyou, Lake Nansi, and Lake Dongping Under Different Hydrological Scenarios	ZHANG Liu-qing, SHI Yu, LI Yuan-peng, et al. (2149)
Succession Characteristics of Algae Functional Groups and Water Quality Assessment in a Drinking Water Reservoir	LI Yan-qing, HUANG Ting-lin, ZHANG Hai-han, et al. (2158)
Effect of Artificial Mixing on Temporal and Spatial Succession of Algae Community Structure in Jinpen Reservoir	WANG Chen-xu, HUANG Ting-lin, LI Nan, et al. (2166)
Spatial Distribution Characteristics and Driving Factors of Aerobic Denitrification Bacterial Community Structure from Baiyangdian Lake in Xiong'an New Area During the Winter Freezing Period	ZHOU Shi-lei, SUN Yue, YUE Ge-cheng, et al. (2177)
Spatial and Temporal Succession Characteristics of Aerobic Anoxygenic Photosynthesis Bacteria in a Stratified Reservoir	ZHANG Hai-han, WANG Yan, HUANG Ting-lin, et al. (2188)
Response of Chromophoric Dissolved Organic Matter Dynamics to Different Hydrological Scenarios in the Two Largest Freshwater Lakes Connected to the Yangtze River	GUO Yan-mi, LI Yuan-peng, SHI Yu, et al. (2198)
Distribution Characteristics and Influencing Factors of Chromophoric Dissolved Organic Matter in a Northern-Side River of the Qinling Mountains in Summer	LIN Zi-shen, HUANG Ting-lin, YANG Shang-ye, et al. (2210)
Distribution, Sources, and Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Tributary Waters of the Lower Reaches of the Yangtze River, China	JIA Tian-qi, LEI Rong-rong, WU Xiao-lin, et al. (2221)
Temporal and Spatial Occurrence of NSAIDs in Taihu Lake and Relevant Risk Assessment	LIAN Jie, LI Yi-fei, WANG Xiao-xuan, et al. (2229)
Occurrence and Ecological Risk of Eight Typical PhACs in Surface Water and Its Impact on <i>Daphnia magna</i>	XU Xin-lei, LIU Jian-chao, LU Guang-hua (2239)
Distribution Characteristics and Migration Rules of Pollutants in Sediments of Reservoirs with <i>Eucalyptus</i> Plantation, Southern China	ZHU Ya, LI Yi-ping, LUO Fan, et al. (2247)
Mechanism of Urban Black Odorous Water Based on Continuous Monitoring: A Case Study of the Erkeng Stream in Nanning	LI Yong-xin, WANG Wei, HE Mei, et al. (2257)
Relationship Between Source-Sink Landscape Pattern and Antibiotics in Surface Water in Peri-urban Watershed	LI Min, TANG Jian-feng, CHEN Li-ding, et al. (2264)
Molecular Chemo-diversity of the Dissolved Organic Matter Occurring in Urban Stormwater Runoff	NIE Yun-han, CHEN Hao, LI Lei, et al. (2272)
Regulating Effect and Mechanism of Calcite/Chlorapatite Mixture Addition on Transformation and Transport of Phosphorus in Sediments	BAI Xiao-yun, LIN Jian-wei, ZHAN Yan-hui, et al. (2281)
Stability of Ferrihydrite and Goethite Nanoparticles Under Different Environmental Conditions	WANG Zhi-qiao, MA Jie, CHEN Ya-li, et al. (2292)
Sunflower-Straw-Derived Biochar-Enhanced Fe(III)/S ₂ O ₈ ²⁻ System for Degradation of Benzoic Acid	SUN Peng, ZHANG Kai-kai, ZHANG Yu, et al. (2301)
Non-activated Peroxymonosulfate-Induced Degradation of Sulfasalazine; Kinetics and Mechanism Investigations	DING Xi, ZHANG Xue-wei, ZHOU Run-sheng, et al. (2310)
Pollution Characteristics and Removal Effects of Antibiotics in Wastewater from Large-Scale Pig Farms in Guizhou	YANG Zhao, LI Jiang, XIANG Fu-liang, et al. (2320)
Nitrogen Removal in Low-C/N Rural Sewage Treatment by Anoxic/Oxic Biofilter Packed with New Types of Fillers	ZHAO Yuan-zhe, YANG Yong-zhe, WANG Hai-yan, et al. (2329)
Nitrogen Removal Performance and Nitrogen/Carbon Balance of Oligotrophic Aerobic Denitrifiers	WEN Gang, WANG Tong, HUANG Ting-lin, et al. (2339)
Bacterial Community Shifts and Nitrogen Removal Characteristics for a SNAD Process Treating Anaerobic Digester Liquor of Swine Wastewater (ADLSW) in a Continuous-Flow Biofilm Reactor (CFBR)	QIN Jia-wei, XIN Xin, LU Hang, et al. (2349)
Characteristics of ANAMMOX Granular Sludge and Differences in Microbial Community Structure Under Different Culture Conditions	JIANG Ying, GUO Meng-lei, XIE Jun-xiang, et al. (2358)
Start-up of an Integrated Process of Denitrifying Phosphorus Removal Coupled with Partial Nitrification and Anaerobic Ammonium Oxidation	CHEN Ya, YIN Wen, ZHANG Xing-xing, et al. (2367)
Construction and Application of an Evaluation System for Soil Environmental Carrying Capacity	LI Xiao-nuo, DING Shou-kang, CHEN Wei-ping, et al. (2373)
Synthesis of Magnetic Biochar and Its Application in the Remediation of Heavy-Metal-Contaminated Soils	WANG Jun-nan, CHENG Shan-shan, ZHAN Wen-hao, et al. (2381)
Remediation of Heavy-Metal-Contaminated Soil by EGTA Washing Enhanced with Reduction Solubilization	ZHANG Jin-yong, ZHU Yu-ting, WANG Ming-xin, et al. (2390)
Toxicity of Chromium to Root Growth of Barley as Affected by Chromium Speciation and Soil Properties	FU Ping-nan, GONG Xiao-fei, LUO Li-yun, et al. (2398)
Effect of Fertilizer Reduction and Biochar Application on Soil Nitrogen Loss in Purple Upland	WANG Shu, WANG Zi-fang, LONG Yi, et al. (2406)
Relationship Between the Composition of Soil Aggregates and the Distribution of Organic Carbon Under Long-Term Abandoned Restoration	WANG Xing, ZHONG Ze-kun, ZHANG Xin-yi, et al. (2416)
Effects of Biochar Application on Soil Microbial Nutrient Limitations and Carbon Use Efficiency in Lou Soil	WANG Qiang, GENG Zeng-chao, XU Chen-yang, et al. (2425)
N ₂ O Emissions from Tea Plantations with Sorghum Intercropping and Application of Big Urea Pills	ZHANG Ke-bin, LIU Xin-liang, KANG Man, et al. (2434)
Effects of Different Forest Vegetation Types on Soil Nitrogen-Related Microbial Communities and Functions in Jinyun Mountain	WANG Ying-yan, WANG Fu-hua, LUO Dong-hai, et al. (2445)
Nitrous Oxide Emission and Denitrifying Bacterial Communities as Affected by Drip Irrigation with Saline Water in Cotton Fields	GUO Hui-nan, MA Li-juan, HUANG Zhi-jie, et al. (2455)
Effect of Organic Matter Promotion on Nitrogen-Cycling Genes and Functional Microorganisms in Acidic Red Soils	CHU Cheng, WU Zhao-yue, HUANG Qian-ru, et al. (2468)
Effects of Simulated Acid Rain on Soil Fungi Diversity in the Transition Zone of Moso Bamboo and Broadleaf Forest	WANG Nan, PAN Xiao-cheng, WANG Chuan-kuan, et al. (2476)
Differences Between DNA- and RNA-Based Bacterial Communities in Marine Sediments	LI Ming-yue, YANG Yu-hong, MI Tie-zhu, et al. (2485)
Spatial Patterns and Spatial Autocorrelations of Wetland Changes in China During 2003-2013	ZHOU Ting, MA Jiao-jiao, XU Song-jun (2496)