

气候条件和作物对黑土和潮土固氮微生物群落多样性的影响*

董志新^{1,4} 孙波^{1†} 殷士学² 隋跃宇³

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008)

(2 扬州大学资源与环境学院, 江苏扬州 225009)

(3 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨 150040)

(4 中国科学院水利部成都山地灾害与环境研究所, 成都 610041)

摘要 固氮微生物是土壤氮素的主要贡献者之一。利用在黑龙江海伦(寒温带)、河南封丘(暖温带)和江西鹰潭(中亚热带)设置的 2 种农田土壤(黑土、潮土)的置换试验,研究了不同气候、土壤和种植条件对固氮微生物多样性的影响。通过直接从土壤中提取 DNA,对固氮酶基因 *nifH* PCR 扩增并进行 DGGE 电泳的分析方法研究了 2 种类型土壤在 3 种不同水热条件下固氮微生物群落多样性的变化特征。研究表明,在置换到不同气候条件下 3 年后,土壤类型是决定固氮微生物结构及多样性的主要影响因子,其次是短期气候条件变化的影响,最后是种植玉米的影响。土壤固氮微生物多样性、优势度与土壤 C/N 及碱解氮含量呈显著正相关($p < 0.01$),与 pH 呈显著负相关;多元回归分析及典范对应分析均表明土壤碱解氮含量是影响固氮微生物多样性的决定因素。水热条件与土壤固氮微生物多样性没有线性相关关系,暖温带条件下黑土固氮微生物多样性最高,而潮土最低。种植玉米提高了土壤固氮微生物多样性。

关键词 *nifH* 基因;微生物多样性;DGGE;气候;土壤类型;玉米

中图分类号 S154.3 **文献标识码** A

生物固氮是大气中惰性氮素进入生物圈循环的主要途径,并组成全球氮循环的中心环节,全球每年由微生物介导固氮达 1.5×10^{13} mol。固氮微生物是除人为施肥因素外土壤氮素来源的主要贡献者,其群落结构组成对土壤氮素固定及维持氮素循环平衡具有重要意义。

土壤微生物群落受多种环境因素影响,包括空间地理条件、季节变化、植被、土层深度、重金属以及有机和无机污染物等。近年来全球变暖加剧,已成为干扰自然生态系统的最大因素之一,引起各国政府和科学界对气候变化的广泛关注,未来几十年内全球平均气温预计将每 10 年升高 0.2°C 。我国预计在 2013 ~ 2022 年,全国平均气温将增加 0.45°C ,降水增加 3%^[1]。气候变暖会引起土壤温度、湿度、pH 等土壤环境因素的变化,可能直接或间接地影响土壤微生物的群落组成,生理生长和生态功能。目前,针对气候条件变化影响固氮微生物多

样性的野外试验研究比较少,对于不同类型土壤中的固氮微生物群落对气候条件变化如何响应仍然不清楚,这影响了针对气候条件进行的农田养分调控措施研究。本试验针对寒温带的黑土和暖温带的潮土,利用在我国东部南北样带上选择 3 个气候带(寒温带、暖温带和亚热带)设置的田间土壤剖面置换试验(2005 年设置),分析气候条件变化对固氮微生物多样性的短期影响规律。土壤置换试验解决了以往研究中从自然环境中直接取样从而无法剔除土壤性质的差异的问题^[2],实现了土壤性质保持一致的情况下对比分析气候因素变化的作用。

现已发现所有固氮微生物中均含有编码铁蛋白的 *nifH* 基因,*nifH* 基因的系统发育树与 16Sr RNA 具有高度的一致性^[3],基于 *nifH* 基因的分子生物学分析为固氮微生物群落结构及多样性的探索提供了一个较传统培养更为灵敏和准确的分析方法。变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electro-

* 国家自然科学基金项目(40871123)、国家重点基础研究发展规划项目(2011CB100506)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-407)资助

† 通讯作者, E-mail: bsun@issas.ac.cn

作者简介:董志新(1983—),女,博士研究生,主要从事土壤养分转化微生物研究。E-mail: zhxdong@imde.ac.cn

收稿日期:2010-07-30;收到修改稿日期:2010-11-09

phoresis, DGGE)则是一种被广泛使用的微生物群落多样性和组成分析的技术手段,由于 DGGE 技术避免了分离纯化培养所造成的分析上的误差,通过指纹图谱直接再现群落结构,目前已经成为微生物群落遗传多样性和动态性分析的强有力工具。申卫收等^[4]采用 16S rDNA PCR-DGGE 指纹图谱技术比较分析了不同土层厌氧微生物多样性、产甲烷潜势以及产甲烷古菌群落多样性的变化,罗青等^[5]成功利用 PCR-DGGE 研究了福建省稻田土壤固氮微生物的多样性。本试验采用 PCR-DGGE 方法研究气候变化对黑土和潮土固氮微生物群落代谢特征的影响,并分析在中国东部南北热量梯度带上土壤性质对土壤固氮微生物结构的影响特征。

1 材料与方法

1.1 试验设计

沿中国东部南北热量梯度带选择中国科学院生态系统研究网络 3 个农业生态试验站设置置换试验。2005 年 10 月采集海伦的黑土(黄土母质发育,

黏化湿润均腐土, Pachic Udic Argiboroll)和封丘的潮土(黄河冲击物发育,淡色潮润锥形土, Fluventic Ustochrept)剖面分别置换至位于寒温带的海伦(47°26'N, 126°38'E)、暖温带的封丘(35°00'N, 114°24'E)和中亚热带的鹰潭(28°15'N, 116°55'E)农业生态试验站。小区规格为:1.2 m 宽 × 1.4 m 长 × 1 m 深,小区隔墙厚 20 cm(高出地面 30 cm),以砖砌水泥覆盖,底部铺有石英沙,内壁覆盖防水布(防止水肥互渗)。

2006 年开始种植一季玉米,玉米品种为适合当地气候的品种,海伦为海育 6 号,封丘为郑单 958,鹰潭为登海 11 号,根据当地种植时间分别在 2006 年 4 月(江西鹰潭)、5 月(黑龙江海伦)、6 月(河南封丘)种植玉米。在试验中设置了 3 个处理:不施肥不种植玉米(N)、不施肥种植玉米(P)、施肥种植玉米(F)。本文为了去除施肥影响,选择了前 2 个处理。试验地点代号:海伦-HL,封丘-FQ,鹰潭-YT;试验土壤代号,黑土-BS,潮土-CS。处理设置 3 个重复,均不灌溉。

表 1 各试验点的水热条件

Table 1 Hydrothermal conditions in three experiment sites in different climate zones

试验站 Experiment station	年均温 Annual mean temperature (°C)	年均降雨量 Annual mean precipitation (mm)	年蒸发量 Annual evaporation (mm)	海拔 Altitude (m)
海伦 Hailun (HL)	1.5	550	—	240
封丘 Fengqiu (FQ)	13.9	605	1 875	67.5
鹰潭 Yingtan (YT)	17.6	1 795	1 318	45.5

1.2 土壤样品采集与保存

2009 年玉米生长旺盛期,用多点混合法采集试验小区表层(0~20 cm)土壤,装入封口无菌聚乙烯袋,置于保鲜盒中带回实验室,挑除土壤中可见的石块、根茬等后分成两部分,一部分置于 4°C 保存,一部分于 -70°C 保存备用。

1.3 测定方法

1.3.1 土壤理化性质测定 土壤理化性质的测定参照文献[6]。pH 用电位法测定(用 0.01 mol L⁻¹的 CaCl₂浸提);土壤有机质用重铬酸钾容量法测定;全氮用自动定氮仪(Büchi, Autokjeldah Unit, K-370)测定;碱解氮用扩散提取法测定;全磷用酸溶-钼锑抗比色法测定;全钾用氢氧化钠熔融-火焰光度计测定;有效磷用碳酸氢钠提取,钼锑抗比色法测定;速效钾用乙酸铵提取,火焰光度计

测定。

1.3.2 土壤微生物总 DNA 提取及 *nifH* 基因的 PCR 扩增 称取 0.5 g -70°C 保存的土壤样品,采用快速土壤 DNA 提取试剂盒(Fast DNA SPIN Kit For Soil),在 Fast-Prep FP220 核酸提取仪快速垂直振荡裂解细胞,按试剂盒给定步骤进行土壤微生物总 DNA 的提取并储存于 -70°C 备用。采用 *nifH* 基因的特异引物对 PolF-PolR^[7]对土壤中固氮微生物进行 PCR 扩增。引物来自 *Azotobacter vinelandii* *nifH* 基因的编码序列(GeneBank 登入号 M20568),正向引物 5'端加 GC 夹子(CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCCC)以利于后续变性梯度凝胶电泳分析。25 μl PCR 扩增体系包括:10 × PCR buffer 2.5 μl, 1.6 mmol L⁻¹ Mg²⁺, 250 μmol L⁻¹ dNTP, 0.6 μmol L⁻¹ 引物, 0.3%

BSA, 0.3 U Hot Taq DNA 聚合酶(上海申能博采)和 1 μl DNA 模板。扩增反应在 MyCycler thermocycler(Bio-Rad)上进行,采用“降落式”扩增方法,反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min,接着 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,重复 10 个循环,随后每个循环退火温度降低 0.2 $^{\circ}\text{C}$,重复 20 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.3.3 DGGE 分析 将 3 次 PCR 扩增的产物混合,取 40 μl 在 CBS 公司变性梯度凝胶电泳系统上进行电泳分离。聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,变性(化学变性剂为 100% 尿素 7 mol L⁻¹ 和 40% (v/v) 的去离子甲酰胺)梯度范围为 35% ~ 60%,变性剂的浓度从胶上方向下方依次递增。胶厚度为 1 mm,电泳缓冲液为 1 \times TAE buffer,60 $^{\circ}\text{C}$ 、70V 电压下电泳 15h。电泳结束后,经 SYBR Green 染色成像。

1.4 数据处理

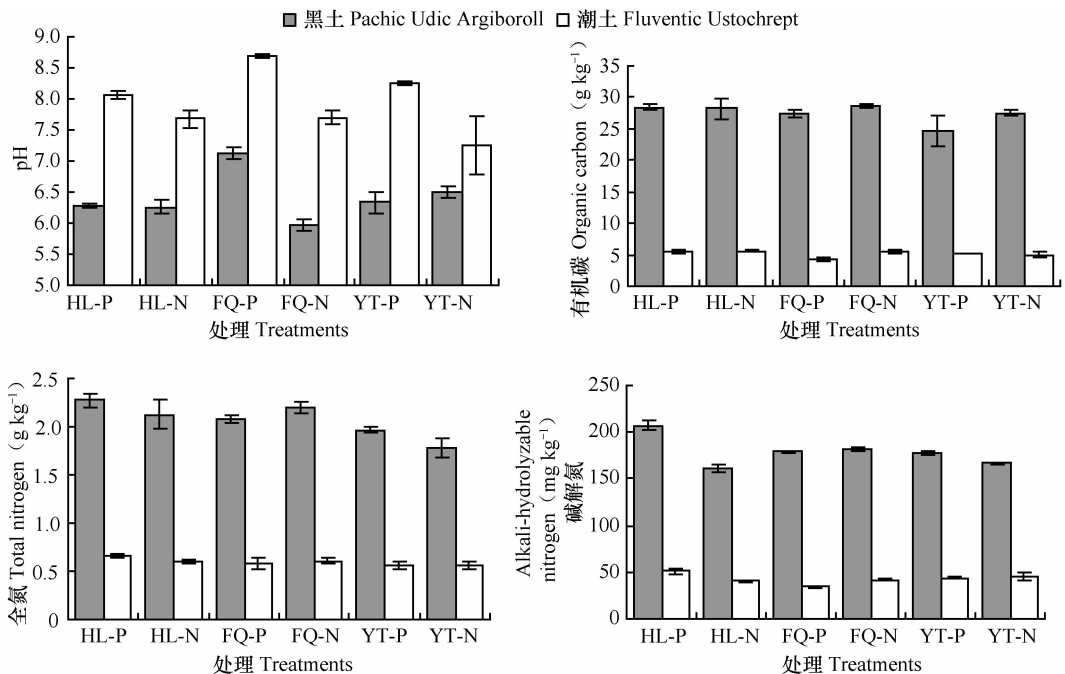
采用 Quantity One 软件(Bio-Rad)对 DGGE 图谱进行数字化处理和聚类分析。Shannon-Wiener 指数(H')以及 Simpson 指数(D)计算公式为: $H' = -\sum p_i \ln p_i$, $D = \sum (p_i)^2$,其中 p_i 为第 i 条带净光密度值与该群落所有条带的净光密度值总和的比率。采用 Canoco 4.53 软件包对环境因子与固氮细

菌群落结构进行典范对应分析(CCA),以 DGGE 中条带的相对密度值作为微生物物种数据,物种矩阵及环境矩阵均转换为 $\log(1+x)$ 进行计算,使用软件中的 forward 选项寻找影响最显著的环境变量,采用蒙特卡罗排列检验(Monte Carlo permutation test, 499 permutations, reduced model)进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不同气候带下黑土和潮土基本理化性质差异

黑土和潮土酸碱度差别较大,黑土呈微酸至中性,潮土呈中性至微碱性,黑土 pH 显著低于潮土;黑土含有较为丰富的养分,其中全氮含量处于 1.79 ~ 2.28 g kg⁻¹,有机碳含量处于 24.67 ~ 28.34 g kg⁻¹,而潮土养分含量相对较低。黑土有机碳、全氮、碱解氮、全磷、全钾、有效磷及速效钾均显著高于潮土(图 1,其中全磷、全钾、有效磷及速效钾未列出),同一气候带相同处理(是否种植作物)下,黑土和潮土土壤理化性质差异显著。不同气候带下同种类型土壤理化性质发生了变化,差异不显著;3 个气候带下黑土和潮土种植玉米 pH 均大于不种植土壤。



HL, 海伦站 Hailun station; FQ, 封丘站 Fengqiu station; YT, 鹰潭站 Yingtang station; P, 种植玉米 Planted with corn; N, 不种植玉米 Without corn

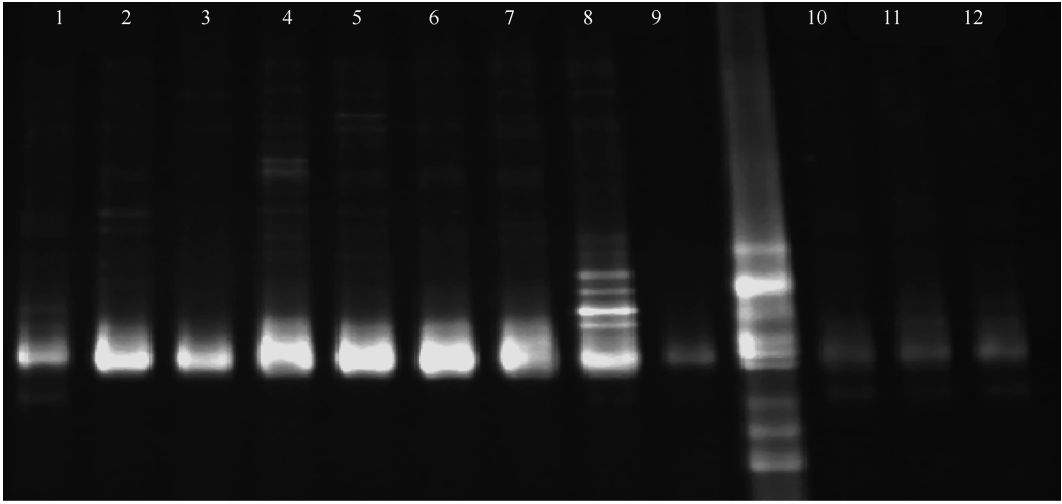
图 1 不同气候带下黑土和潮土表土(0~20 cm)理化性质的比较(2009 年玉米生长旺盛期)

Fig. 1 Soil physicochemical properties in the surface layer (0~20 cm) of Pachic Udic Argiboroll and Fluventic Ustochrept in different climate zones

2.2 黑土和潮土固氮微生物 DNA 片段的 DGGE 分析

将 3 次扩增得到的带 GC 夹的 400 bp 左右土壤固氮微生物 *nifH* 基因 PCR 扩增产物进行变性梯度凝胶电泳,染色成像后得到图谱(图 2)。不同泳道代表不同土壤样品中的固氮微生物群落,泳道中条带的多少代表固氮细菌群落物种数的多少,条带的明暗代表某一物种数量的多少。对 DGGE 图谱进

行统计发现,不同处理土壤固氮微生物的 DGGE 图谱的条带数目、位置和亮度存在一定程度的差异,显示了各供试土壤固氮微生物的多样性,3 个不同气候带下黑土和潮土固氮微生物组成结构发生了变化;此外供试土壤间具有一些共同的条带,表明供试土壤之间存在一些共有的细菌类型,但这些公共条带的亮度不相同,显示土壤固氮微生物在物种丰富度有一定的变化。



1: YT-BS-N; 2: YT-CS-N; 3: FQ-CS-N; 4: HL-CS-N; 5: YT-CS-P; 6: FQ-CS-P;
7: HL-CS-P; 8: FQ-BS-N; 9: HL-BS-N; 10: YT-BS-P; 11: FQ-BS-P; 12: HL-BS-P
HL, 海伦站 Hailun station; FQ, 封丘站 Fengqiu station; YT, 鹰潭站 Yingtan station; P, 种植玉米
Planted with corn; N, 不种植玉米 Without corn; BS, 黑土 Pachic Udic Argiboroll; CS, 潮土 Fluventic Ustochrept

图 2 *nifH*PCR 扩增产物 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE analysis of amplified *nifH* fragments from different soils

应用 QuantityOne 软件对 DGGE 图谱的条带及其亮度进行数字化处理,得到各条带的迁移率及强度,并以此为据进行相似性分析(Dice Coefficient),采用非加权成对算术平均法(UPGMA)聚类,得到黑土和潮土各 6 个处理固氮微生物组成的聚类分析结果(图 3)。结果显示:黑土和潮土分别聚为一大类,不同类型土壤固氮微生物结构存在较大差异,相似性不到 45%。具体考查同一种类型土壤发现,相同气候带下的 2 个样品首先聚为一类(除封丘黑土外),相似性相对较高(潮土 >80%,黑土 >55%),是否种植作物对黑土和潮土固氮细菌群落结构的影响较气候条件小。表明短期气候条件变化下,土壤性质是影响固氮细菌群落结构的主要因子;其次是气候条件,而是否种植作物对固氮细菌群落结构的影响相对较小。

根据 DGGE 图谱检测到的条带数目、条带强度和迁移率,分别计算了不同处理下土壤固氮细菌群落的 Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数。结果表明,黑土固氮微生物群落较潮土表现为较高的多样

性、优势度(图 4);同时气候条件的差异影响了两类土壤固氮微生物的结构特征,黑土在暖温带封丘表现最高的多样性和优势度,而潮土固氮微生物多样性和优势度在暖温带最低;此外,除海伦潮土外,种植作物土壤较不种植具有较高的固氮微生物多样性和优势度。

2.3 黑土和潮土固氮微生物群落结构与环境因子的关系

为进一步揭示细菌群落结构与环境参数的关系,本文采用 CANOCO 4.53 软件进行典范对应分析。对不同土壤 DGGE 条带的典范对应排序结果如图 5 所示。在此二维排序图(biplot)中,样本与环境因子在同一个图上反映出来,可以直观地看出群落分布、物种分布与环境变量之间的关系。环境因子用箭头表示,箭头所处的象限表示环境因子与排序轴间的正负相关性,箭头连线长度代表该环境因子与样本分布相关程度的大小,而箭头连线间的夹角代表环境因子间的相关性大小。

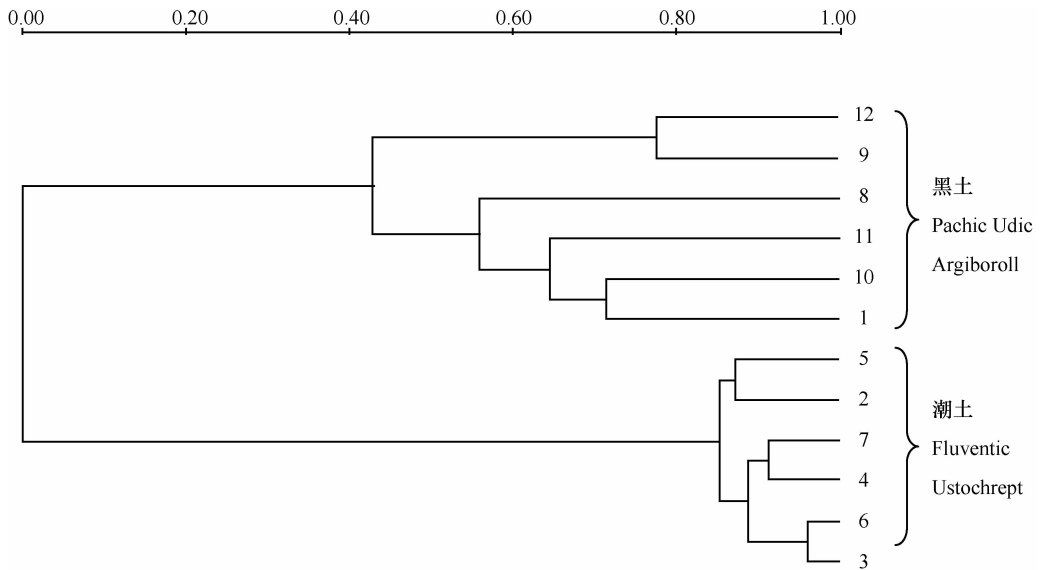
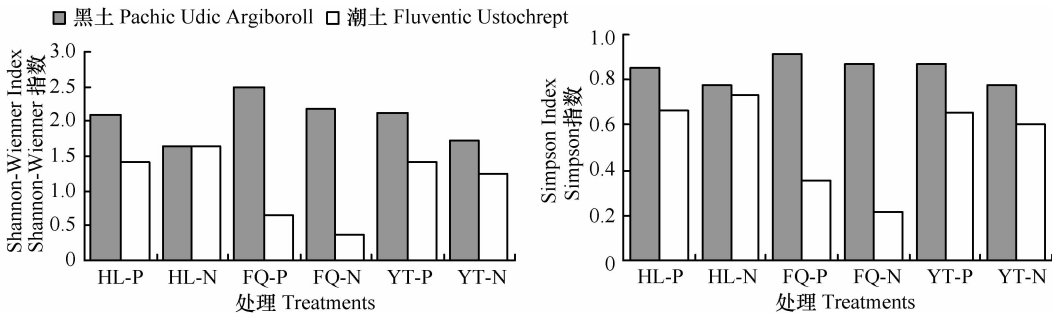


图3 黑土和潮土不同气候带下固氮细菌群落相似性分析(Ward's, Dice 指数)

Fig. 3 Cluster analysis of DGGE banding profiles of DNA extracted from Pachic Udic Argiboroll and Fluventic Ustochrept in different climate zones using Ward's with Dice index



HL, 海伦站Hailun station; FQ, 封丘站Fengqiu station; YT, 鹰潭站Yingtian station; P, 种植玉米Planted with corn; N, 不种植玉米Without corn

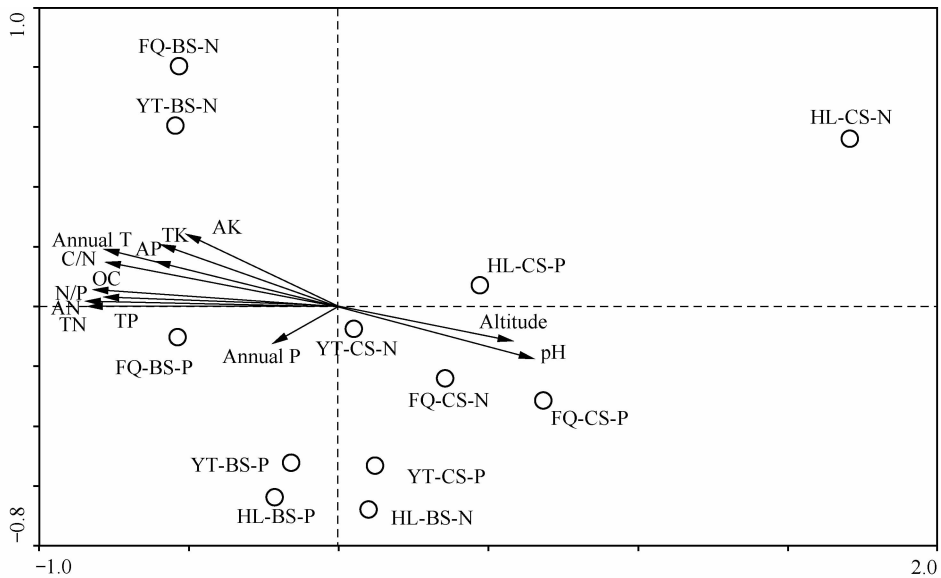
图4 黑土和潮土不同气候带下固氮微生物群落多样性分析

Fig. 4 Community diversity of nitrogen-fixing bacteria in two types of soils in different climate zones calculated from DGGE gels

第一排序轴(Axis 1)解释了样本中 22.0% 的变异,第二排序轴(Axis 2)解释了样本中 15.1% 的变异,两个排序轴合并解释了 37.1% 的样本总变异。虽然这一比例并不很高,但是根据 Gauch 的解释,物种数据信息中经常包含大量的噪音,排序图虽然仅能解释一小部分总变异,但其中也蕴涵丰富的信息^[8]。该排序图中,第一排序轴主要由海拔、pH(正相关)和碱解氮、年均温、全磷、全氮、有机碳、有效

磷、C/N(负相关)组成。黑土和潮土分别分布在第一排序轴的正轴和负轴方向,与聚类分析较为一致。

从 CCA 分析可以得出各个环境变量的重要性^[9]。根据 CANOCO 的 forward 分析,在 10 个环境因子中,碱解氮和年均温对土壤细菌群落结构组成具有显著影响($p = 0.002$, $p = 0.04$)。土壤 TP 和 pH 的影响虽然未达显著性水平,但大于其他环境因子。



Annual P: 年均降雨量 Annual mean precipitation; Annual T: 年均温 Annual mean temperature; Altitude: 纬度 Altitude; OC: 有机碳 Organic carbon; TN: 全氮 Total nitrogen; TK: 全钾 Total potassium; TP: 全磷 Total phosphorus; AN: 碱解氮 Alkali-hydrolyzable nitrogen; AP: 有效磷 Available phosphorus; AK: 速效钾 Available potassium

图5 气候变化下不同土壤样本细菌群落组成的典范对应分析

Fig. 5 Ordination plot generated from CCA analysis of soil properties and other environment varieties and of microbiological character using autometal forward selection

3 讨论

已有研究表明,绝大部分的固氮微生物均位于土壤的最表层,并且可能占表层微生物总数的5%^[10];所有固氮微生物中均含有编码铁蛋白的*nifH*基因,编码固氮酶铁蛋白组分结构基因*nifH*核苷酸序列具有高度的保守性^[11],所以*nifH*基因常被用来作为检测固氮菌的一个分子标靶;同时本研究的样品采自微生物较为活跃的季节。因此,本研究得到的固氮微生物*nifH*基因能够很大程度反映所研究土壤固氮微生物的多样性。

不同的生态环境因子可能影响土壤微生物的活性,尤其是固氮微生物^[12-13],研究发现微生物多样性在一定范围内随纬度增加、温度降低而降低,与pH呈正相关^[14]。本文利用在中国东部不同气候带设置的土壤置换试验来研究短期的气候条件变化对不同类型土壤固氮微生物群落结构的影响,发现固氮微生物群落结构主要受土壤性质的影响,短期的气候变化不足以对其产生决定性改变。

3.1 土壤性质及其对固氮微生物多样性的影响

土壤类型是影响土壤微生物群落结构和种群

密度的主要因素,增加土壤养分含量如N、P、K等会促进固氮微生物的生长繁殖^[15]。本研究发现,两种不同类型土壤固氮微生物种群结构和多样性存在明显差异,土壤置换至不同气候带3年以及是否种植玉米对土壤固氮微生物影响相对较小。土壤pH、土壤全量养分和速效养分与固氮微生物群落多样性、优势度显著相关(表2)。Keeling^[16]和Limmer^[17]等研究表明,土壤的C/N影响着土壤固氮微生物的活性,生物地理化学性状影响着固氮微生物群落的组成和分布,C/N高的土壤中,固氮微生物的活性可能要高^[18],这与本文研究结果相符合。另一方面,黑土养分含量丰富,黏粒含量高,而潮土较为松散,含氧量较黑土高,而氧是固氮酶活性的限制因子^[19],固氮酶暴露于空气中立即失活。这可能也是黑土固氮微生物较为丰富的原因之一。此外,Dasilva等^[20]发现土壤类型而非玉米栽培品种强烈影响了2种不同土壤中玉米根际土壤类芽孢杆菌(*Paenibacillus*)的结构和数量。

土壤基本性质差异是影响固氮微生物群落多样性最重要的因素,为进一步考察具体某种或某几种因素的决定作用,以气候条件和土壤性质作为自变量,固氮微生物多样性作为因变量进行逐步回归分析,得到一元线性方程: Shannon-Wiener 指数

$H' = 6.938 \times \text{碱解氮} (\text{g kg}^{-1}) + 0.815$ ($p = 0.002$, $r = 0.802$), 在本研究的设计上土壤碱解氮含量是影

响土壤固氮微生物多样性的关键因素, 这与前面的典范对应分析也较一致。

表 2 土壤性质和气候条件与土壤固氮微生物多样性的相关关系

Table 2 Correlation of soil properties, climate conditions with diazotrophs diversity

	Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener index H'	Simpson 指数 Simpson index D
pH	-0.68 *	-0.69 *
有机碳 Organic carbon (OC)	0.77 **	0.75 **
全氮 Total nitrogen (TN)	0.78 **	0.75 **
碱解氮 Alkali-hydrolyzable nitrogen (AN)	0.80 **	0.77 **
全磷 Total phosphorus (TP)	0.74 **	0.70 *
有效磷 Available phosphorus (AP)	0.66 *	0.67 *
全钾 Total potassium (TK)	0.56	0.49
速效钾 Available potassium (AK)	0.63 *	0.65 *
C/N	0.73 **	0.72 **
年均温 Annual mean temperature (Annual T)	-0.1	0.07
年均降雨量 Annual mean precipitation (Annual P)	0.14	0.04

3.2 种植玉米对固氮微生物多样性的影响

种植作物种类会影响固氮酶活性^[21-22]以及固氮微生物基因结构, 有研究表明稻田土壤固氮细菌组成在表土和根际土间均存在较大差异^[5]。本研究发现除海伦潮土外, 同种类型土壤在相同气候条件下种植玉米提高了土壤固氮微生物多样性和优势度。种植玉米有利于某些联合固氮及内生固氮微生物的生长繁殖, 前人的很多研究发现, 玉米 (*Zea mays* L.) 根际可与多种固氮细菌形成联合固氮关系, 如固氮螺菌属 (*Azospirillum*)^[23]、克雷白氏杆菌 (*Klebsiella*)^[24]、泛菌 (*Pantoea*)^[25] 等。但 La-tour 等^[26] 对荧光假单胞菌 (*Pseudomonas*) 属的细菌种群多样性研究也表明, 土壤类型是主要的影响因子, 寄主植物类型的影响较小, 与本文结果一致。

3.3 气候条件的短期变化对固氮微生物结构和多样性的影响

气候条件通过温度和降水等影响土壤含氧量、碱解氮含量、土壤酶活性以及根系活动进而可能影响固氮微生物的种群结构。关于当代环境因素和历史因素对微生物群落相对影响作用, Martiny 等^[27] 曾在 2006 年提出假说: 如同动植物一样, 微生物群落组成及多样性的差异既折射了过去历史因素的痕迹, 也反映了当代的环境因素变化。最近的研究表明, 土壤细菌群落多样性 60.3% 的变异可归因于包括地理位置、土层剖面等历史因素, 5.5% 变

异可解释为环境干扰^[28]。

虽然温度和降雨量与土壤固氮微生物多样性之间没有显著相关关系, 但土壤温度是影响微生物活性的重要因素, 在一定温度范围内, 土壤温度升高提高了土壤微生物活性及呼吸率。海伦由于水热条件差, 其黑土微生物多样性较低; 与封丘相比, 黑土在鹰潭的有机质矿化增加、淋溶损失也增加, 土壤全氮和碱解氮含量下降, 导致鹰潭黑土的固氮微生物多样性较低。对于潮土而言, 养分含量低可能是限制微生物生长的首要因子, 养分缺失影响固氮微生物活性, 增加 N、P、K 等可刺激固氮微生物的生长^[15]。潮土 C/N (7.25 ~ 9.16) 远较黑土 (12.41 ~ 15.34) 低, 海伦较低的温度和相对较小的降雨量使该地区可以保持较高的有机质和碱解氮含量, 有利于固氮微生物的生长; 而封丘相对较低的有机质及碱解氮含量, 不利于固氮微生物的生长繁殖。Joshua 等^[30] 对针叶林系统的研究发现, 潮湿和干燥的时间长度对土壤微生物影响很大, 长时间干燥导致微生物群落结构改变, 微生物呼吸和生物量降低。本研究也发现 3 年气候条件的变化改变了同种类型土壤固氮微生物的多样性特征。

由此可见, 尽管短期气候变化不足以抵消不同类型土壤结构及性质对固氮微生物的长期效应, 但气候变化仍可通过温度和降水改变土壤养分及土壤结构, 进而可能影响固氮微生物的活性和多样性。

4 结 论

本文运用 PCR-DGGE 分子指纹图谱结合高级统计分析首次对黑土和潮土在 3 个不同气候带下固氮微生物群落结构进行了研究,并对影响固氮细菌群落组成的土壤理化性质、气候条件以及农田作物的种植作了比较分析。结果表明短期气候条件变化下,土壤类型是固氮微生物群落结构的主要影响因素,不同土壤类型固氮微生物群落结构差异大于不同气候带下固氮微生物群落结构差异;其次是气候条件,温度和降水量等的变化通过影响土壤碱解氮含量等土壤因素影响固氮微生物的种群结构;最后是种植方式,种植玉米提高了土壤固氮微生物多样性。

参 考 文 献

- [1] 王绍武,叶瑾琳. 近百年全球气候变暖的分析. 大气科学, 1995, 19(5): 545—553. Wang S W, Ye J L. An analysis of global warming during the last one hundred years (In Chinese). Scientia Atmospherica Sinica, 1995, 19(5): 545—553
- [2] 孙波,郑宪清,胡锋,等. 水热条件与土壤性质对农田土壤硝化作用的影响. 环境科学, 2009, 30(1): 206—213. Sun B, Zheng X Q, Hu F, et al. Effect of temperature, rainfall and soil properties on farmland soil nitrification (In Chinese). Environmental Science, 2009, 30(1): 206—213
- [3] Young J P W, Stacy G, Burris R H, et al. Biological nitrogen fixation, phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. Chapman and Hall, 1992: 43—86
- [4] 申卫收,尹睿,林先贵,等. 绰墩山遗址古水稻土的一些微生物学特性研究. 土壤学报, 2006, 43(5): 814—820. Shen W S, Yin R, Lin X G, et al. Microbiological properties of an ancient paddy soil discovered in Chudunshan relics of Kunshan, China (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(5): 814—820
- [5] 罗青,宋亚娜,郑伟文. PCR-DGGE 法研究福建省稻田土壤微生物地区多态性. 中国生态农业学报, 2008, 16(3): 669—674. Luo Q, Song Y N, Zheng W W. Determination of microorganism diversity in the paddy fields of Fujian Province by PCR-DGGE method (In Chinese). Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2008, 16(3): 669—674
- [6] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999. Lu R K. Analysis methods of soil and agricultural chemistry (In Chinese). Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 1999
- [7] Poly F, Jocteur M L, Bally R. Improvement in RFLP procedure to study the community of nitrogen fixers in soil through the diversity of *nifH* gene. Research in Microbiology, 2001, 152: 95—103
- [8] Gauch H G. Multivariate analysis in community ecology. UK: Cambridge University Press, 1982
- [9] Terbraak C J F, Verdonschot P F M. Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. Aquatic Sciences, 1995, 57(3): 255—289
- [10] Mergel A, Schmitz O, Mallmann T, et al. Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 36(1): 33—42
- [11] Zehr J P, McCreynolds L A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(10): 2 522—2 526
- [12] Atlas R M, Bartha R. Microbial ecology, fundamentals and applications. New York: Addison-Wesley Press, 1981: 125
- [13] Dommergues Y, Mangenot F. Soil microbial ecology. Paris: Masson Press, 1970: 56—57
- [14] Staddon W J, Trevors J T, Duchesne L C, et al. Soil microbial diversity and community structure across a climatic gradient in western Canada. Biodiversity and Conservation, 1998, 7(8): 1 081—1 092
- [15] Teng Q H, Sun B, Fu X R, et al. Analysis of *nifH* gene diversity in red soil amended with manure in Jiangxi, South China. The Journal of Microbiology, 2009, 47(1): 1—7
- [16] 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. Bioresource Technology, 1998, 66(2): 89—97
- [17] Limmer C, Drake H L. Non-symbiotic N₂-fixation in acidic and pH-neutral forest soil: Aerobic and anaerobic differentials. Soil Biology and Biochemistry, 1996, 28(2): 177—183
- [18] 张于光,王慧敏,李迪强,等. 三江源高寒草甸土固氮基因(*nifH*)的多样性和系统发育研究. 微生物学报, 2005, 45(2): 166—171. Zhang Y G, Wang H M, Li D Q, et al. Molecular diversity and phylogenetic analysis of nitrogen-fixing (*nifH*) genes in alp prairie soil of Sanjiangyuan natural reserve (In Chinese). Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(2): 166—171
- [19] Montañez A, Abreu C, Gill P R, et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. Biology and Fertility of Soils, 2009, 45(3): 253—263
- [20] Dasilva K R A, Salles J F, Seldin L. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. Journal of Microbiological Methods, 2003, 54(2): 213—231
- [21] Wheatley R, Ritz K, Griffiths B. Microbial biomass and mineral-N transformations in soil planted with barley, ryegrass, pea or turnip. Plant and Soil, 1990, 127(2): 157—167
- [22] Priha O, Grayston S J, Pennanen T, et al. Microbial activities related to C and N cycling and microbial community structure in the rhizospheres of *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* seedlings in an organic and mineral soil. FEMS Microbiology

- Ecology, 1999, 30(2): 187—199
- [23] Christiansen-Weniger C, Vanderleyden J. Ammonium-excreting *Azospirillum* sp. become intracellular established in maize (*Zea mays*) para-nodules. Biology and Fertility of Soils, 1993, 17(1):1—8
- [24] Chelius M K, Triplett E W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(2):783—787
- [25] Palus J A, Borneman J, Ludden P W, et al. Isolation and characterization of endophytic diazotrophs from *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Iltis and Doebley. Plant Soil, 1996, 186(3): 135—142
- [26] Latour X, Corberand T S, Laguerre G, et al. The composition of fluorescent *Pseudomonas* population associated with roots is influenced by plant and soil type. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(7): 2 449—2 456
- [27] Martiny J B H, Bohannan B J M, Brown J H, et al. Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(2): 102—112
- [28] Ge Y, He J Z, Zhu Y G, et al. Differences in soil bacterial diversity: Driven by contemporary disturbances or historical contingencies? The ISME Journal, 2008, 2(3): 254—264
- [29] Xiao H L, Zheng X J. Effects of soil warming on soil microbial activity. Soil and Environmental Sciences, 2001, 10(2): 138—142
- [30] Joshua P S, Jay M G, Joy S C C. Moisture effects on microbial activity and community structure in decomposing birch litter in the Alaskan taiga. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31(6): 831—838

IMPACTS OF CLIMATE AND CROPPING ON COMMUNITY DIVERSITY OF DIAZOTROPHS IN PACHIC UDIC ARGIBOROLL AND FLUVENTIC USTOCHREPT

Dong Zhixin^{1,4} Sun Bo^{1†} Yin Shixue² Sui Yueyu³

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 College of Resources and Environmental Sciences, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

(3 Northeast Institute of Geography and Agricultural Ecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150040, China)

(4 Institute of Mountain Hazards and Environment, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract In agricultural soils, besides anthropogenic sources, diazotrophs are the main source of nitrogen. Effects of temporary climate disturbance and cropping of maize on composition and diversity of nitrogen fixing bacteria in Pachic Udic Argiboroll and Fluventic Ustochrept were examined with the technique of *nifH*-gene targeted polymerase chain reaction (PCR)-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approach combined with advanced statistical analysis, based on soil reciprocal transplantation experiments which were set up along a latitude gradient with distinctly different temperature and precipitation. Both cluster analysis and canonical correspondence analysis (CCA) show that soil properties could be the dominant factor to stimulate variation of diazotrophic composition, whereas temporary climate disturbances also caused a certain extent of differences. Contents of organic carbon and alkali-hydrolyzable N were found to be in significantly positive correlation with Shannon and Simpson indices while pH was in significantly negative correlation. Statistical analysis show that the content of alkali-hydrolyzable N was the determinant variable which explained the differences in diazotrophic composition among all samples ($p = 0.002$). Hydrothermal conditions didn't have any linear correlation with diazotrophic biodiversity. However, Pachic Udic Argiboroll showed the highest diazotrophic biodiversity while Fluventic Ustochrept showed the lowest under warm temperate climate. In addition, maize plantation increased slightly the diversity of nitrogen-fixing bacterial in all soils, except for in Fluventic Ustochrept in Hailun.

Key words *nifH* gene; Microbial diversity; DGGE; Climate; Soil type; Maize