

DOI: 10.11766/trxb202412250509

CSTR: 32215.14.trxb202412250509

吴彦霖, 黄薇, 王圆媛, 胡正华, 丁雪丽. 大气 CO₂ 浓度升高影响稻田土壤固氮潜势的微生物机理[J]. 土壤学报, 2025,
WU Yanlin, HUANG Wei, WANG Yuanyuan, HU Zhenghua, DING Xueli. Microbial Mechanisms Underlying the Effects of Elevated
Atmospheric CO₂ Concentrations on Nitrogen Fixation Potential in Paddy Soils[J]. Acta Pedologica Sinica, 2025,

大气 CO₂ 浓度升高影响稻田土壤固氮潜势的微生物机理*

吴彦霖¹, 黄薇¹, 王圆媛^{2†}, 胡正华¹, 丁雪丽^{1†}

(1. 南京信息工程大学气象灾害预报预警与评估协同创新中心/生态与应用气象学院, 南京 210044; 2. 淮阴师范学院生命科学学院, 江苏淮安 223300)

摘要: 生物固氮可将惰性氮气转化为植物可利用态氮, 是维持土壤氮素循环和支撑农业生态系统生产力的核心环节。本研究旨在阐明大气 CO₂ 浓度升高影响稻田土壤生物固氮过程的微生物驱动机制, 为气候变化背景下稻田氮循环优化和农业可持续氮管理提供科学依据。利用基于开顶式气室的 CO₂ 浓度自动调控平台, 设置 CK (环境 CO₂ 浓度) 和 EC (环境 CO₂ 浓度升高 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) 2 个处理, 通过微宇宙培养、实时荧光定量 PCR、高通量测序等技术分析稻田土壤理化性质、固氮潜势 (NFP)、固氮菌 (*nifH* 基因) 的丰度及群落组成等指标, 探讨大气 CO₂ 浓度升高影响稻田生物固氮的微生物驱动机制。结果表明, 就全生育期而言, 与 CK 相比, EC 处理使稻田土壤微生物生物量氮 (MBN) 含量显著升高 3.3%, 使土壤 NH₄⁺-N 含量显著下降 11.6%。同时, EC 处理使稻田土壤的 NFP 和 *nifH* 基因丰度均显著增加。在水稻成熟期, EC 处理的 *nifH* 基因群落结构较 CK 处理发生了显著变化。此外, 稻田土壤 TN 含量与土壤 NFP 呈显著正相关, 而土壤 NFP 由土壤 MBN 含量、土壤有机碳含量和 *nifH* 基因丰度综合调控。综上, 大气 CO₂ 浓度升高通过增加土壤 MBN 含量和固氮菌的数量, 从而使 NFP 增强并增加稻田土壤氮含量。

关键词: 大气 CO₂ 浓度升高; 生物固氮; *nifH* 基因; 土壤氮含量; 气候变化

中图分类号: S154.36 文献标志码: A

Microbial Mechanisms Underlying the Effects of Elevated Atmospheric CO₂ Concentrations on Nitrogen Fixation Potential in Paddy Soils

WU Yanlin¹, HUANG Wei¹, WANG Yuanyuan^{2†}, HU Zhenghua¹, DING Xueli^{1†}

(1. Collaborative Innovation Center on Forecast and Evaluation of Meteorological Disasters, School of Ecology & Applied Meteorology, Nanjing University of Information Science & Technology, Nanjing 210044, China; 2. School of Life Science, Huaiyin Normal University, Huai'an, Jiangsu 223300, China)

Abstract: 【Objective】Biological nitrogen fixation, which converts inert nitrogen into plant-available nitrogen, is a critical process for maintaining the soil nitrogen cycle and supporting the productivity of agroecosystems. However, the effect of atmospheric CO₂ on biological nitrogen fixation in paddy fields remains poorly understood. Thus, this study aims to elucidate

* 国家自然科学基金项目 (42205174, 42375114, 42071023) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 42205174, 42375114, 42071023)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wyy@hytc.edu.cn; dingxueli@nuist.edu.cn

作者简介: 吴彦霖 (2002—), 男, 福建平潭人, 硕士研究生, 主要从事农业气象研究。E-mail: 202412080169@nuist.edu.cn

收稿日期: 2024-12-25; 收到修改稿日期: 2025-04-27; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2025-04-27

the microbial-driven mechanism of biological nitrogen fixation in paddy soils affected by elevated atmospheric CO₂. The findings of this study will provide a scientific basis for the optimization of nitrogen cycling in paddy fields and sustainable nitrogen management in agriculture under climate change scenarios. 【Method】In this study, the microbial-driven mechanism of biological nitrogen fixation in paddy fields were investigated by elevated atmospheric CO₂ concentration. Two treatments, CK (ambient CO₂ concentration) and EC (elevated ambient CO₂ concentration by 200 μmol·mol⁻¹) were set up by using an open-top chamber (OTC)-based platform for the automated control of CO₂ concentration. Soil physicochemical properties, nitrogen fixation potential (NFP), and the abundance and community composition of nitrogen-fixing bacteria (*nifH* gene) of paddy soils were analyzed by microcosmic cultivation, real-time quantitative PCR, and high-throughput sequencing. 【Result】The results showed that across the whole rice plant growth period and compared with CK, EC treatment significantly increased the microbial biomass nitrogen (MBN) content by 3.3% and significantly decreased the NH₄⁺-N content by 11.6%. Also, the NFP and *nifH* gene abundance were significantly increased by EC treatment. At the maturity stage, the community structure of the *nifH* gene in the EC treatment changed significantly compared with CK. In addition, the TN content was positively correlated with NFP, which was regulated by soil MBN content, SOC content, and *nifH* gene abundance. 【Conclusion】This study reveals that elevated atmospheric CO₂ concentration increased soil MBN content and *nifH* gene abundance, enhanced NFP and increased the nitrogen content of paddy soils.

Key words: Elevated atmospheric CO₂ concentration; Biological nitrogen fixation; *nifH* gene; Soil nitrogen content; Climate change

众所周知, 二氧化碳 (CO₂) 是对全球变暖影响最大的温室气体, 在过去 10 年中, 其浓度以每年 2.46 μmol·mol⁻¹ 的惊人速度增长^[1], 截止目前已达到 423 μmol·mol⁻¹^[2]。全球气候变化导致近年极端天气及自然灾害频发, 严重影响了农业和自然生态系统的和谐与稳定, 愈加威胁到人类的生存和发展。若不采取一系列的减排措施, 预计在 2030—2052 年间, 全球平均气温将较工业化前水平上升 1.5 °C^[3]。

氮 (N) 是农田生态系统生产力的限制因素, 其在大气中含量虽占空气总体积的 78%, 但不能被农作物直接吸收利用^[4]。生物固氮 (BNF) 可将大气中的氮气 (N₂) 催化还原成农作物可利用的形式, 可为农业生态系统提供氮输入 51~130 Tg·a⁻¹^[5]。水稻是世界三大粮食作物之一, 目前全球种植面积约为 1.7×10⁶ km²^[6]。稻田生态系统能进行 BNF 而不断为水稻生长提供氮素, 同时受气候变化的影响很大^[7]。在稻田土壤氮循环中, BNF 作为减少大气 N₂ 的主要途径, 可有效增加农田生态系统可利用氮。此外, 氮肥的使用在一定程度上提高了稻谷产量, 但易造成氮素利用率大幅下降、植株抗逆性差等生产问题, 还易引发土壤 N 淋溶量增加、周边水体富营养化等环境问题^[8]。而 BNF 在保证水稻产量的同时亦可降低化学氮肥对环境的污染^[4]。

nifH 基因是编码固氮还原酶亚基蛋白的关键基因, 已成为分析各种环境微生物群落中 N₂ 固定的有效标记物之一, 被广泛用于重氮营养群落的研究^[9]。然而, 关于大气 CO₂ 浓度升高对稻田土壤固氮潜势 (NFP) 及固氮微生物群落特征的影响研究却较为匮乏^[9-10]。Bhattacharyya 等^[9]表明, 大气 CO₂ 浓度升高会增加稻田土壤固氮细菌 *nifH* 基因群落的功能活性和结构多样性, 从而促进稻田土壤 BNF 作用, 这可能由于大气 CO₂ 浓度升高增加了土壤中较容易利用的碳输入, 刺激了固氮菌 *nifH* 基因的增殖, 从而增强了 N₂ 在热带水稻土中的固定。Yu 等^[10]研究表明, 大气 CO₂ 浓度升高对固氮菌 *nifH* 基因群落和优势菌群的结构影响不大。

由于大多数固氮菌难以培养, 大气 CO₂ 浓度升高条件下固氮微生物的群落特征很难确定。大气 CO₂ 浓度升高如何通过影响土壤性质间接影响土壤固氮微生物群落, 并影响稻田土壤 NFP 亦需进一步探索。本研究利用开顶式气室 (OTCs) 进行大气 CO₂ 浓度升高模拟实验, 结合 ¹⁵N 同位素示踪及分子生物学技术, 研究大气 CO₂ 浓度升高对稻田土壤理化性质、NFP、固氮菌 *nifH* 基因的丰度和群落特征的影响, 系统探索大气 CO₂ 浓度升高影响稻田土壤固氮菌群落及 NFP 的潜在机制, 旨在探索

未来气候变化条件下稻田土壤固氮菌群落发挥最大 NFP 的管理措施, 为维持我国农田生态系统的氮素平衡及提高农业生产力提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地点位于南京信息工程大学农业气象与生态试验站 (32°21'N, 118°71'E)。水稻试验于 2023 年进行, 试验季节平均气温 25.85 °C, 降雨量 403.10 mm。试验地土壤为潴育型水稻土, 黏粒含量为 26.1%, 土壤有机碳 (SOC) 和全氮 (TN) 含量分别为 11.95 g·kg⁻¹ 和 1.45 g·kg⁻¹, pH 为 6.3。

1.2 试验设计

利用模拟 CO₂ 浓度升高自动调控平台, 于 2023 年水稻季 (6~10 月) 开展水稻控制性试验。采用完全随机设计, 设置对照 (CK) 和 CO₂ 浓度升高 (EC, CO₂ 浓度升高 200 μmol·mol⁻¹) 2 个处理, 每种处理有 3 个重复。

田间试验平台由 12 个正八边形棱柱体开顶式气室组成, 单个气室采用铝合金框架与高透光玻璃, 顶部设计 45°内倾导流结构以优化气体滞留, 内置 CO₂ 传感器及自动调控系统, 通过计算机程序实时监测并控制电磁阀和加压模块, 当浓度低于阈值时自动释放杜瓦罐 CO₂ 气体维持目标浓度。整个水稻季环境 CO₂ 浓度和升高 CO₂ 浓度为 (438.9±10.8) μmol·mol⁻¹ 和 (635.2±11.5) μmol·mol⁻¹。

供试水稻品种为南粳 9108。田间水分管理方式为前期淹水-中期烤田-后期干湿灌溉。肥料运筹包括基肥、蘖肥和穗肥, 基肥使用复合肥 (N:P:K=15:15:15), 蘖肥和穗肥使用尿素 (N 质量分数为 46.6%), 基肥、蘖肥和穗肥分别占 60%、20%和 20%。

1.3 样品采集与测定

在水稻分蘖期、拔节期、扬花期和成熟期, 使用 50 mm 不锈钢土钻于根际 50~100 mm 土层采集土壤样品, 用于观测理化性质、NFP 及固氮菌丰度与群落组成等指标。

土壤理化性质分析参照鲁如坤^[11]的方法。土壤铵态氮 (NH₄⁺-N) 含量使用 2 mol·L⁻¹ KCl 浸提-靛酚蓝比色法测定; 土壤硝态氮 (NO₃⁻-N) 含量使用酚二磺酸比色法进行测定; 微生物生物量氮 (MBN) 含量使用氯仿熏蒸-K₂SO₄ 浸提法进行测定; 以 1:2.5 的水土比悬浮液振荡摇匀 0.5 h, 测定土壤 pH。利用重铬酸钾氧化-外加热法测定 SOC 含量, 利用 H₂SO₄-H₂O₂ 消煮法和 AA3 型连续流动分析仪 (Seal Analytical GmbH, 德国) 测定 TN 含量。

土壤 NFP 采用 ¹⁵N 同位素示踪测定^[12]。将过 2 mm 筛的 2 g 新鲜土壤样本和水制成泥浆并冲氮气 30 min, 避光培养 24 h。添加 0.5 mL 丰度为 99%¹⁵N-N₂, 同时利用针头排出等体积泥浆, 避光培养 36 h。分别向培养前、后泥浆样品加入 0.2 mL 次溴酸钠碘溶液并震荡摇匀, 以 1 500 r·min⁻¹ 转速离心 5 min 后利用膜进样质谱仪测定 N₂ 同位素信号强度。计算公式如下:

$$f = \frac{(^{15}\text{N}_{\text{Final}} - ^{15}\text{N}_{\text{Initial}}) \times V}{W \times T} \quad (1)$$

式中, f 为生物 NFP (N nmol·g⁻¹·h⁻¹); ¹⁵N_{Final}、¹⁵N_{Initial} 分别为培养前后体系中 ¹⁵NH₄⁺-N 的浓度, μmol·L⁻¹; V 为泥浆体积, mL; W 为干土质量, g; T 为培养时间, h。

土壤固氮菌丰度及群落组成采用 E.Z.N.A.®土壤试剂盒测定。利用土壤试剂盒提取 0.5 g 新鲜土壤总 DNA, 使用引物 nifHF/nifHR 通过实时荧光定量 PCR (ABI PRISM 7500, 美国) 测定土壤固氮菌 *nifH* 基因拷贝数^[13], 扩增体系含 2X Taq Master Mix 和模板 DNA, 程序为 95 °C 预变性 5 min 后进行 35 个循环扩增。基于重组质粒构建标准曲线换算获得单位干土基因拷贝数 (copies·g⁻¹), 并通过 Illumina Miseq PE300 平台测序分析 *nifH* 基因群落多样性, 原始数据已提交 NCBI 数据库 (编号 PRJNA1080318)。

1.4 数据分析

采用单因素方差分析研究不同 CO₂ 浓度下土壤理化性质、NFP、*nifH* 基因丰度及群落的差异。通过非度量多维尺度分析 (NMDS) 和距离矩阵非参数多变量方差分析 (Adonis) 检验 EC 处理与 CK 处理的固氮菌群落结构差异显著性。利用皮尔逊 (Pearson) 相关分析揭示固氮菌群落组成及 NFP 与土壤指标的相关性, 冗余分析 (RDA) 解析群落组成与理化性质的关系, 并基于逐步回归筛选 NFP 的关键调控因子。

2 结果

2.1 CO₂ 浓度升高对稻田土壤理化性质的影响

CO₂ 浓度升高条件下稻田土壤理化性质如表 1 所示。与 CK 相比, EC 处理使分蘖期 NH₄⁺-N 含量显著降低 22.6%, 使拔节期土壤 MBN 含量显著增加 4.5% ($P < 0.05$), 但对各生育期土壤 SOC、TN、C/N、NO₃⁻-N、pH 的影响并不显著 ($P > 0.05$)。就全生育期而言, 与 CK 相比, EC 处理使稻田土壤 NH₄⁺-N 含量显著下降 11.6% ($P < 0.05$), 使 MBN 含量显著升高 3.3% ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 大气 CO₂ 浓度升高条件下稻田土壤理化性质

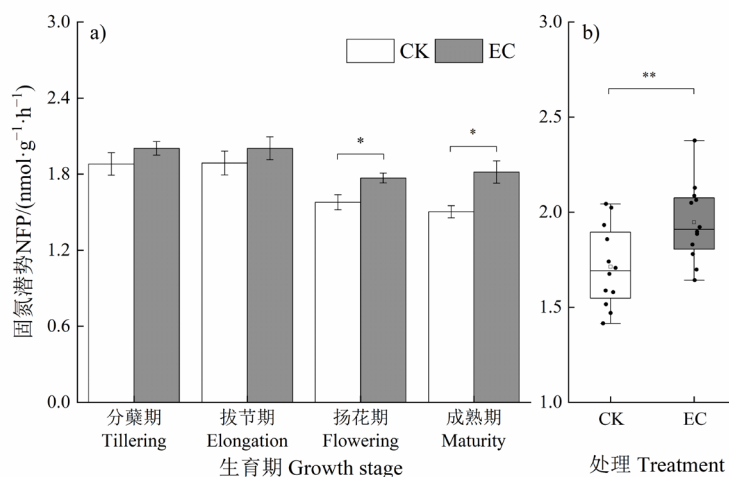
Table 1 Physiochemical properties of paddy soils under elevated atmospheric CO₂ concentration

生育期 Growth stage	处理 Treatment	土壤有机碳 SOC/ (g·kg ⁻¹)	全氮 TN/ (g·kg ⁻¹)	碳氮比 C/N	NH ₄ ⁺ -N/ (mg·kg ⁻¹)	NO ₃ ⁻ -N/ (mg·kg ⁻¹)	微生物生物量氮 MBN/ (mg·kg ⁻¹)	pH
分蘖期	CK	12.62±0.08	1.42±0.01	8.88±0.05	57.07±1.12	15.30±0.34	29.40±0.36	6.96±0.08
Tillering	EC	12.58±0.08	1.43±0.01	8.82±0.06	44.16±1.52**	14.74±1.78	30.52±0.48	6.81±0.07
拔节期	CK	12.46±0.08	1.44±0.02	8.62±0.04	45.63±1.77	16.98±0.75	28.69±0.25	6.88±0.10
Elongation	EC	12.67±0.06	1.45±0.02	8.72±0.13	40.00±1.55	15.40±0.76	29.98±0.25*	6.79±0.08
扬花期	CK	12.23±0.04	1.42±0.01	8.64±0.01	34.65±1.25	14.37±1.06	27.84±0.28	6.87±0.06
Flowering	EC	12.18±0.07	1.43±0.01	8.51±0.08	34.93±2.84	13.99±1.46	28.77±0.32	6.96±0.07
成熟期	CK	12.16±0.02	1.43±0.01	8.52±0.09	27.18±2.99	12.31±1.15	26.56±0.28	6.89±0.09
Maturity	EC	12.19±0.07	1.44±0.01	8.48±0.02	26.44±1.58	11.57±0.58	26.96±0.29	6.89±0.09
平均	CK	12.37±0.03	1.43±0.01	8.67±0.03	41.13±1.64	14.74±0.14	28.12±0.34	6.98±0.04
Average	EC	12.40±0.06	1.44±0.01	8.63±0.04	36.38±0.62*	13.92±0.44	29.06±0.44*	6.86±0.04

注: CK, 环境 CO₂ 浓度; EC, CO₂ 浓度升高 200 μmol·mol⁻¹。表中数据为平均值±标准误 ($n = 3$); *和**分别表示不同处理在 0.05 和 0.01 水平上存在差异显著。下同。Note: CK, Ambient CO₂ concentration; EC, Elevated ambient CO₂ concentration by 200 μmol·mol⁻¹. Data are the mean values ± SE ($n = 3$); * and ** indicate significant differences between different treatments at the 0.05 and 0.01 levels, respectively. The same below.

2.2 CO₂ 浓度升高对稻田土壤 NFP 的影响

CO₂ 浓度升高条件下稻田土壤 NFP 如图 1 所示。与 CK 相比, EC 处理分别使扬花期和成熟期的 NFP 显著提高了 12.1%和 20.8%($P < 0.05$),但对拔节期和成熟期 NFP 的促进作用并不显著($P > 0.05$) (图 1a)。就全生育期而言, EC 处理的 NFP 较 CK 显著提高了 13.7% ($P < 0.05$) (图 1b)。



注: a) 各生育期, b) 全生育期。*和**分别表示处理在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平上存在显著差异。下同。Note: a) Nitrogen fixation potential at different growth stages of rice; b) Average nitrogen fixation potential across the total growth period of rice; * and ** indicate significant differences between different treatments at the $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels, respectively. The same below.

图 1 大气 CO_2 浓度升高对稻田土壤固氮潜势的影响

Fig. 1 Effects of elevated atmospheric CO_2 concentration on nitrogen fixation potential in paddy soils

2.3 CO_2 浓度升高对稻田土壤固氮菌丰度的影响

CO_2 浓度升高条件下稻田土壤固氮菌 *nifH* 基因拷贝数如图 2 所示。与 CK 相比, EC 处理分别使分蘖期和扬花期稻田土壤的 *nifH* 基因丰度显著提高了 12.4% 和 28.1% ($P < 0.05$), 但拔节期和成熟期土壤 *nifH* 基因丰度的促进作用并不显著 ($P > 0.05$) (图 2a)。就全生育期而言, 与 CK 相比, EC 处理的 *nifH* 基因丰度较 CK 显著提高了 13.2% ($P < 0.05$) (图 2b)。

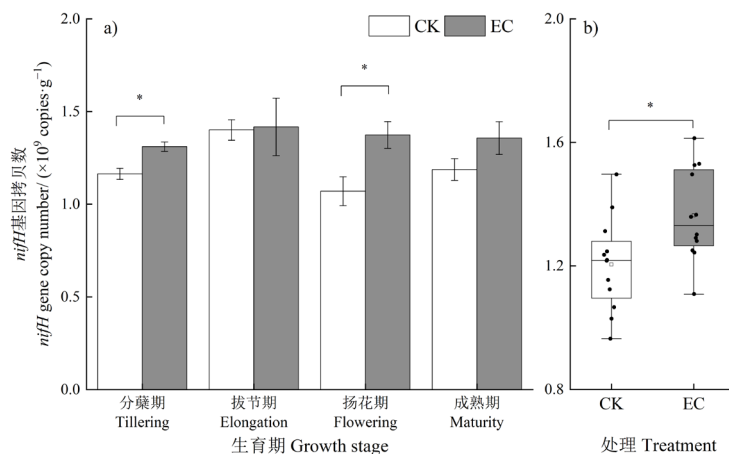


图 2 大气 CO_2 浓度升高对稻田土壤 *nifH* 基因拷贝数的影响

Fig. 2 Effects of elevated atmospheric CO_2 concentration on *nifH* gene copy number in paddy soils

2.4 CO_2 浓度升高对稻田土壤固氮菌群落的影响

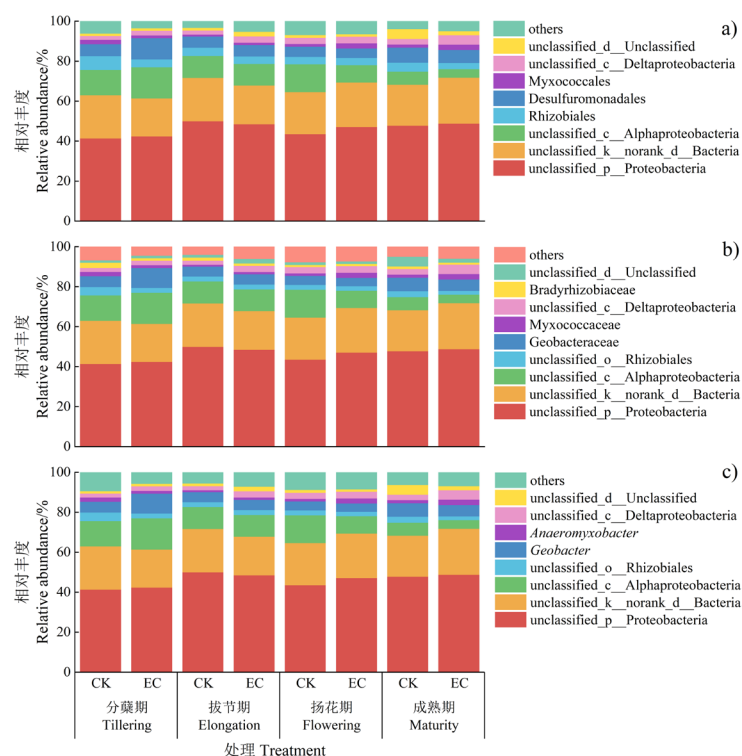
固氮菌 *nifH* 基因的测序样本在归一化处理后, 各文库包含 18 759 条基因序列, 单个样品 OTU 数量为 2 320~2 878。利用 Shannon 指数和 Chao1 指数评估了土壤 *nifH* 基因的丰富度和多样性(表 2)。结果表明, 在各生育期, EC 处理的固氮菌群落的 Shannon 指数和 Chao1 指数较 CK 处理均无显著差异 ($P > 0.05$), 表明 CO_2 浓度升高并未改变的固氮菌群落丰富度和多样性 (表 2)。

表 2 大气 CO_2 浓度升高条件下稻田土壤固氮菌群落多样性

Table 2 Community diversity of nitrogen-fixing bacteria in paddy soils under elevated atmospheric CO_2 concentration

生育期 Growth stage	处理 Treatment	OTU 数 No. of OTUs	Shannon 指数 Shannon index	Chao1 指数 Chao1 index
分蘖期 Tillering	CK	2 320±119	6.14±0.30	2 945.8±140.3
拔节期 Elongation	EC	2 376±260	6.18±0.46	3 095.2±325.4
扬花期 Flowering	CK	2 357±276	6.28±0.33	3 108.9±334.5
成熟期 Maturity	EC	2 711±94	6.67±0.04	3 495.6±116.6
	CK	2 588±268	6.38±0.24	3 389.1±389.5
	EC	2 687±44	6.70±0.06	3 525.8±73.2
	CK	2 789±146	6.52±0.15	3 772.1±219.9
	EC	2 878±310	6.82±0.26	3 683.5±376.6

CO₂ 浓度升高条件下稻田土壤固氮菌群落组成如图 3 所示（相对丰度平均比例> 1%）。在目水平上，Rhizobiales、Desulfuromonadales 和 Myxococcales 三个已知目分别占 3.07%~6.96%、4.76%~10.60% 和 0.94%~2.70%（图 3a）；在科水平上，Geobacteraceae、Myxococcaceae 和 Bradyrhizobiaceae 三个已知科分别占 4.17%~9.94%、0.94%~2.70%和 1.01%~2.60%（图 3b）；在属水平上，*Geobacter* 和 *Anaeromyxobacter* 两个已知属，分别占 4.14%~9.91%和 0.94%~2.70%（图 3c）。在目、科和属水平上，各生育期 EC 和 CK 的土壤固氮菌群落组成均没有显著差异（ $P > 0.05$ ），EC 没有显著改变稻田土壤固氮菌的群落组成（图 3a, b, c）。

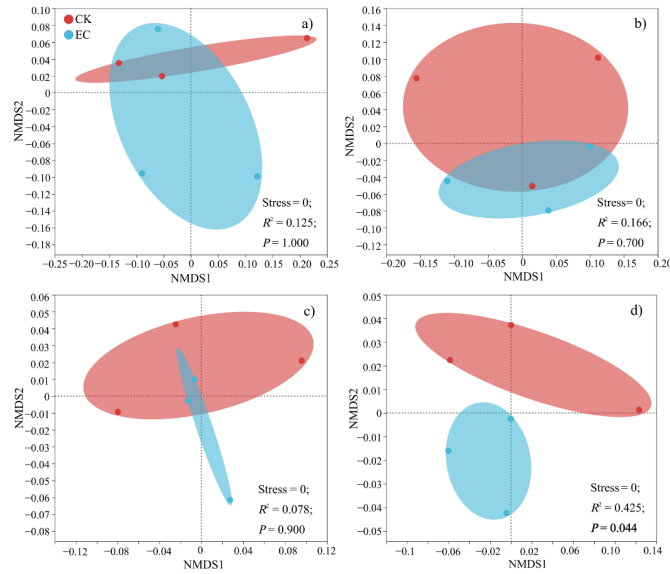


注：a)目水平，b)科水平，c)属水平。Note: a) Order level; b) Family level; c) Genus level.

图 3 大气 CO₂ 浓度升高条件下稻田土壤固氮菌群落相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of nitrogen-fixing bacteria community in paddy soils under elevated atmospheric CO₂ concentration

利用 NMDS 分析了 CO₂ 浓度升高条件下稻田土壤固氮菌在属水平上群落结构的变化（图 4）。在分蘖期、拔节期与扬花期时，EC 和 CK 的固氮菌群落相交，表明 EC 对固氮菌群落结构的影响不大（图 4a, b, c）；而在成熟期，EC 处理与 CK 处理的固氮菌群落明显分离，说明 EC 处理明显改变了稻田土壤固氮菌的群落结构（图 4d）。



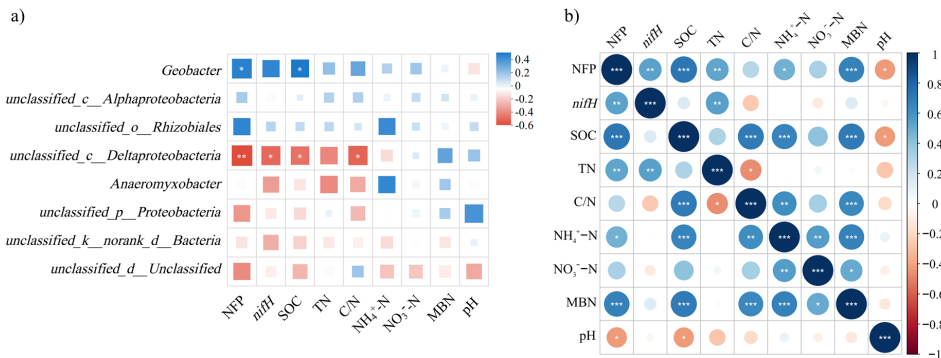
注: a)分蘖期, b)拔节期, c)扬花期, d)成熟期。Note: a) Tilling, b) Elongation, c) Flowering, and d) Maturity stages.

图 4 大气 CO₂ 浓度升高对稻田土壤固氮菌群落结构的影响

Fig. 4 The effect of elevated atmospheric CO₂ concentration on nitrogen-fixing bacterial community structure in paddy soils

2.5 影响稻田土壤固氮菌群落及 NFP 的因素

Pearson 分析结果表明, 固氮菌 *Geobacter* 相对丰度与 NFP、SOC 含量呈显著正相关 (图 5a)。 *unclassified_Deltaproteobacteria* 与 NFP、*nifH* 基因丰度、SOC 含量、C/N 呈显著正相关 (图 5a)。此外, NFP 与 *nifH* 基因丰度以及土壤 SOC、TN、NH₄⁺-N、MBN 浓度呈显著正相关, 但与土壤 pH 呈显著负相关 (图 5b)。同时, *nifH* 基因丰度与 TN 呈显著正相关 (图 5b)。



注: a) *nifH* 基因群落相对丰度与土壤指标的相关性, b) 稻田 NFP 与土壤指标的相关性。蓝色表示正相关, 红色表示负相关, 正方形或圆形宽度越大表示相关系数越大。*, **, *** 分别表示在 $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ 水平上显著。Note: a) the correlation between the relative abundance of *nifH* gene community and soil indicators, b) the correlation between nitrogen fixation potential in paddy fields and soil indicators. Blue indicates a positive correlation, and red indicates a negative correlation. The larger the width of a square or circle, the greater the correlation coefficient. *, **, and *** denote significance at $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively.

图 5 大气 CO₂ 浓度升高条件下稻田土壤固氮微生物群落及 NFP 与土壤指标的相关性热图

Fig. 5 Heat map of the correlation between nitrogen-fixing microbial community and nitrogen-fixing potential of paddy soil and soil indicators under elevated atmospheric CO₂ concentration

RDA 分析结果表明, 土壤 SOC、C/N、MBN、pH 浓度对固氮菌群落结构有显著影响 ($P < 0.05$), 但土壤 NO₃⁻-N、TN、NH₄⁺-N 对稻田土壤固氮菌群落结构的影响不显著 ($P > 0.05$) (图 6)。逐步回归分析显示, 基于土壤 MBN 含量、SOC 含量和 *nifH* 基因丰度的线性模型可解释 75.2% 的稻田土壤 NFP 变异 ($P < 0.05$) (图 7)。稻田 NFP 受土壤固氮菌丰度、土壤 MBN 含量以及土壤碳含量的综合控制。

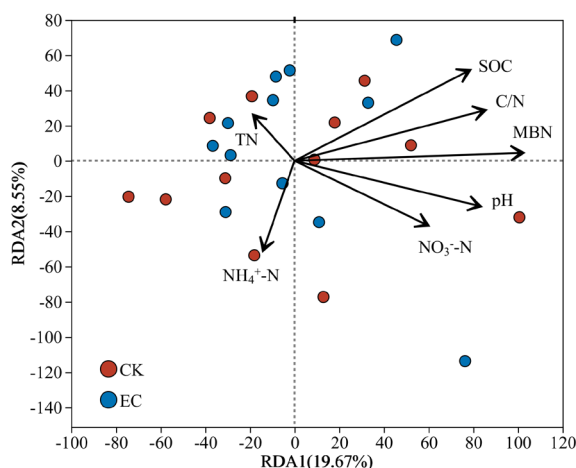
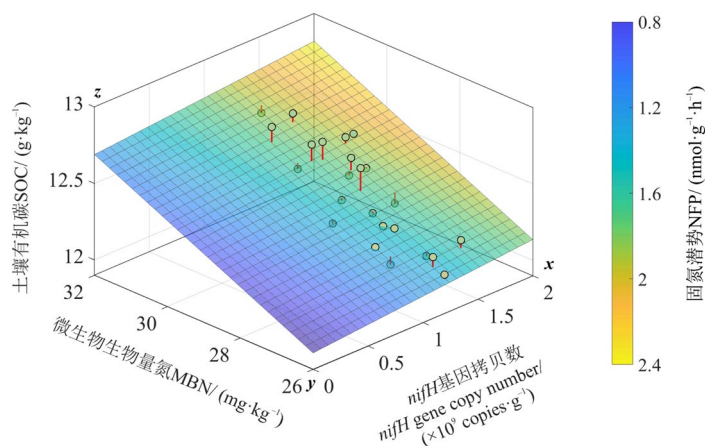


图 6 大气 CO₂ 浓度升高条件下稻田土壤固氮菌群落结构与土壤性质的冗余分析

Fig. 6 The Redundancy Analyses (RDA) of the correlations between soil properties and nitrogen-fixing bacterial communities under elevated atmospheric CO₂ concentration

$$\text{NFP}(x,y,z) = 0.592x + 0.048y + 0.476z - 6.201 \quad (R^2 = 0.752, P < 0.001)$$



注：数据代表 4 个生育期各处理的 3 个重复值 ($n = 24$)。Note: The data represent three duplicate values for each treatment in the four growth stages ($n = 24$).

图 7 大气 CO₂ 浓度升高条件下稻田土壤 NFP 与土壤性质的多元回归分析

Fig. 7 Multiple regression analysis fitting nitrogen fixation potential with soil properties in paddy soils under elevated atmospheric CO₂ concentration

3 讨论

土壤氮库中 95% 以上为有机氮，其中 MBN 是气候响应下氮循环的关键活性组分。本研究表明，就全生育期而言，CO₂ 浓度升高使稻田土壤 MBN 含量显著增加（表 1），与以往研究结果一致^[14-15]。这主要是由于土壤 MBN 与有效氮的正相关关系^[14]。EC 通过促进植物的光合作用，提高根系沉积，进一步加速水稻土氮循环，从而导致 MBN 含量的变化。此外，土壤矿质氮（NH₄⁺-N、NO₃⁻-N）作为作物根际吸收的主要氮形态，对气候变化的响应也较为强烈^[16]。本研究发现，就全生育期而言，

CO₂ 浓度升高使稻田土壤矿质氮含量显著降低（表 1），这可能是由于大气 CO₂ 浓度升高促进了水稻干物质积累和氮吸收而使土壤矿质氮降低^[16]。此外，CO₂ 浓度升高条件下土壤 MBN 的大量增长亦可能导致土壤矿物氮的降低^[17]。

有研究表明，EC 可增强稻田土壤 *nifH* 基因群落的功能活性和结构多样性，从而促进稻田土壤 BNF 作用^[9]。与此类似，本研究表明 EC 显著提高了稻田土壤全生育期 NFP（图 1）。这可能是由于 EC 增加了稻田土壤 MBN 含量，激活固氮微生物活性并促进氮固持（图 7）^[17]。同时，EC 加剧的微生物-植物氮竞争进一步刺激固氮菌增殖^[17-18]。已有研究已经证实，CO₂ 浓度升高会促进土壤固氮菌的生长^[7, 19-20]。与此类似，本研究发现，EC 对各生育期土壤 *nifH* 基因丰度均存在促进作用，虽然仅在分蘖期和扬花期达到显著。*nifH* 基因丰度与 NFP 对 EC 的响应呈同步性（图 1，图 2），二者显著正相关（图 5）^[5, 21]。然而，EC 对拔节期水稻土 NFP 和 *nifH* 基因丰度的提升均不显著，可能因烤田期土壤水分骤降抑制了固氮菌活性^[22]。而成熟期 NFP 未显著增加则与 EC 加剧氮竞争导致土壤的土壤 pH 和 NH₄⁺-N 含量降低有关（图 5）。NH₄⁺-N 通过“氮阻遏效应”调控固氮活性，其过度消耗引发碳源不足或微生物失衡间接抑制固氮^[20, 23]。此外，固氮菌最适 pH 为 7.5~8.0，酸性环境（成熟期 pH 降低）抑制其代谢^[24]，且土壤微生物可能已适应高 CO₂ 环境，导致氮输入难以持续激活固氮活性。

本研究水稻土固氮菌目以 Rhizobiales、Desulfuromonadales 和 Myxococcales 为主（图 3a）^[19, 25]。科水平优势类群为 Geobacteraceae、Myxococcaceae 和 Bradyrhizobiaceae（图 3b）。Geobacteraceae 和 Bradyrhizobiaceae 均隶属于变形菌门 Proteobacteria^[26]。Geobacteraceae 是稻田中一种重要的异化 Fe(III) 还原微生物，可填补厌氧微生物食物链中的关键生态位^[27]，Bradyrhizobiaceae 的菌株已被分离出来作为水稻根系的内生菌^[26, 28]，Myxococcaceae 多以复杂的碳化合物为食^[29]。在属水平上，检测到了 *Geobacter* 和 *Anaeromyxobacter* 优势固氮菌属。Liu 等^[20]发现 CO₂ 浓度升高使 *Geobacter* 相对丰度增加，但本研究未观测到类似现象，可能与土壤氧化还原状态、测序深度及实验条件差异有关。尽管 *Geobacter* 相对丰度未显著变化，但其与土壤碳含量及 NFP 的正相关性（图 5）揭示其可能通过驱动碳库积累促进 *nifH* 基因表达及生物固氮^[30]。*Anaeromyxobacter* 作为典型兼性厌氧菌^[31]，可还原 Fe 等金属，将 NO₃⁻-N 还原为 NO₂⁻-N 和 NH₄⁺-N^[32]，其固氮酶基因在水稻土中广泛检出，证实其对生物固氮的贡献^[33]。但不同 CO₂ 处理下固氮菌优势属丰度及多样性指数无显著差异，可能与供试水稻品种的低响应特性及 C/N 输入不足以驱动种群扩增有关，暗示 CO₂ 升高可能优先增强固氮速率而非改变群落结构。

CO₂ 浓度升高下稻田土壤固氮作用受温度、降水及土壤理化性质等多因素驱动，在本研究中，稻田固氮菌群落结构主要受 SOC、C/N、MBN 和 pH 的协同调控，其驱动机制源于碳氮能量代谢与土壤微环境因子的互作效应。EC 引起 SOC 微增、C/N 与 pH 微降及 MBN 显著提升（表 1），促使成熟期固氮菌群落结构发生显著变化（图 4、图 6）。这可能是由于水稻后期对 NH₄⁺-N 的竞争性吸收导致 MBN 再矿化，同时根系泌氢加剧土壤酸化，驱动固氮菌群向耐酸功能群演替^[34]。逐步回归分析进一步揭示，土壤固氮菌丰度、MBN 含量以及 SOC 含量对固氮过程的调控占据主导地位（图 7）。SOC 作为电子供体强化固氮酶活性并优化微生物生境^[35]，MBN 通过促进氮固定酶表达间接增强 NFP，*nifH* 基因与 NFP 协同提升直接驱动固氮势能^[5, 21]。同时，土壤 NFP 的增强亦会增加稻田土壤中的 TN 含量（图 5），可能形成正向反馈，通过改善稻田土壤肥力进一步促进初级生产力。

CO₂ 持续升高可能诱导固氮菌群落的代际适应性进化，通过改变氮转化酶活性影响氮滞留效率^[36]。此外，固氮菌 *nifH* 基因拷贝数的种属差异可能导致菌群组成与基因拷贝数定量出现偏差^[37]，而硝化/反硝化微生物对氮循环亦具关键作用。未来需构建多时间尺度观测体系，整合宏基因组学、代谢组学与 ¹⁵N 同位素示踪技术，解析气候变化条件下氮循环功能基因（*nirK*、*amoA*、*nifH* 等）表达与种群动态，追踪微生物群落演变规律，结合作物氮素利用效率与土壤氮形态转化速率，阐明气候驱动下作物-土壤氮循环的微生物调控机制，为实现固氮潜能最大化与氮素可持续平衡提供科学支

撑。

4 结 论

稻田土壤 NFP 和固氮菌 *nifH* 基因丰度对大气 CO₂ 浓度升高的响应具有一致性,就全生育期而言,两者均随 CO₂ 浓度升高而显著增加。大气 CO₂ 浓度升高可引起稻田土壤 MBN 含量的显著增加,在此影响下,水稻成熟期土壤的固氮菌群落结构亦发生了显著变化。此外,大气 CO₂ 浓度升高条件下,土壤 pH 是稻田土壤 NFP 的限制因素,但并未显著影响土壤 MBN 含量和固氮菌数量的增加对 NFP 增强的贡献。

参考文献 (References)

- [1] WMO. The state of greenhouse gases in the atmosphere based on global observations through 2022[EB/OL]. (2023-11-15)[2023-11-25]. <https://wmo.int/publication-series/wmo-greenhouse-gas-bulletin-no-19>.
- [2] NOAA-ESRL. CO₂ Earth's: Numbers for living on Earth [EB/OL]. (2024-12-24)[2024-12-24]. <https://www.co2.earth/daily-co2>.
- [3] IPCC. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty[M]/Technical summary: Global warming of 1.5°C. Cambridge: Cambridge University Press, 2019.
- [4] Xie Z B, Zhang Y H, Wang H. Advances and perspectives in paddy biological nitrogen fixation[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57(3): 540-546. [谢祖彬, 张燕辉, 王慧. 稻田生物固氮研究进展及方向[J]. 土壤学报, 2020, 57(3): 540-546.]
- [5] Davies-Barnard T, Friedlingstein P. The global distribution of biological nitrogen fixation in terrestrial natural ecosystems[J]. Global Biogeochemical Cycles, 2020, 34(3): e2019GB006387.
- [6] Liu Y L, Ge T D, van Groenigen K J, et al. Rice paddy soils are a quantitatively important carbon store according to a global synthesis[J]. Communications Earth & Environment, 2021, 2: 154.
- [7] Bhattacharyya P, Roy K S, Neogi S, et al. Impact of elevated CO₂ and temperature on soil C and N dynamics in relation to CH₄ and N₂O emissions from tropical flooded rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Science of the Total Environment, 2013, 461: 601-611.
- [8] Dong S Q, Zhou T, Zhang B, et al. Effects of novel nitrogen fertilizers application on the community composition of nitrogen-fixing microorganisms in maize rhizosphere soils[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2024, 43(2): 360-367. [董思奇, 周彤, 张冰, 等. 新型氮肥对玉米根际土壤固氮微生物群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(2): 360-367.]
- [9] Bhattacharyya P, Roy K S, Das M, et al. Elucidation of rice rhizosphere metagenome in relation to methane and nitrogen metabolism under elevated carbon dioxide and temperature using whole genome metagenomic approach[J]. Science of the Total Environment, 2016, 542: 886-898.
- [10] Yu Z H, Li Y S, Hu X J, et al. Elevated CO₂ increases the abundance but simplifies networks of soybean rhizosphere fungal community in Mollisol soils[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2018, 264: 94-98.
- [11] Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000. [鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.]
- [12] Shan J, Wu M, Jin K, et al. A microbial inoculant for regulating nitrogen in paddy fields and its preparation method: China, CN112430123A [P]. 2021-03-02. [单军, 吴敏, 金科, 等. 中国科学院南京土壤研究所. 一种稻田氮素调控微生物菌剂及其制备方法: 中国, CN112430123A[P]. 2021-03-02.]
- [13] Rösch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3818-3829.
- [14] Diao T T, Peng Z P, Niu X G, et al. Changes of soil microbes related with carbon and nitrogen cycling after long-term CO₂ enrichment in a typical Chinese maize field[J]. Sustainability, 2020, 12(3): 1250.

- [15] Waqas M A, Li Y E, Ashraf M N, et al. Long-term warming and elevated CO₂ increase ammonia-oxidizing microbial communities and accelerate nitrification in paddy soil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2021, 166: 104063.
- [16] Xu C C, Zhang K H, Zhu W Y, et al. Large losses of ammonium-nitrogen from a rice ecosystem under elevated CO₂[J]. *Science Advances*, 2020, 6(42): eabb7433.
- [17] Liu Y, Guo Z H, Xue C, et al. Changes in N₂-fixation activity, abundance and composition of diazotrophic communities in a wheat field under elevated CO₂ and canopy warming[J]. *Applied Soil Ecology*, 2021, 165: 104017.
- [18] Du Y L, Guo X Y, Li J X, et al. Elevated carbon dioxide stimulates nitrous oxide emission in agricultural soils: A global meta-analysis[J]. *Pedosphere*, 2022, 32(1): 3-14.
- [19] Yu Y J, Zhang J W, Petropoulos E, et al. Divergent responses of the diazotrophic microbiome to elevated CO₂ in two rice cultivars[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1139.
- [20] Liu J M, Han J J, Zhu C W, et al. Elevated atmospheric CO₂ and nitrogen fertilization affect the abundance and community structure of rice root-associated nitrogen-fixing bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 628108.
- [21] Gao B, Hu S W, Jing L Q, et al. Impact of elevated CO₂ and reducing the source-sink ratio by partial defoliation on rice grain quality — A 3-year free-air CO₂ enrichment study[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 788104.
- [22] Gundale M J, Nilsson M, Bansal S, et al. The interactive effects of temperature and light on biological nitrogen fixation in boreal forests[J]. *New Phytologist*, 2012, 194(2): 453-463.
- [23] Yang Z L, Chen X H, Hou J T, et al. Soil texture and pH exhibit important effects on biological nitrogen fixation in paddy soil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2022, 178: 104571.
- [24] Tian S N, Zhang Q, Dong Y F, et al. Effects of acid mine drainage on physicochemical factors and nitrogen-fixing microorganisms in the root zone of mature rice[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2024, 40(6): 271-280. [田胜尼, 张琴, 董玉飞, 等. 酸性矿山废水对成熟期水稻根区理化因子及固氮微生物的影响[J]. *生物技术通报*, 2024, 40(6): 271-280.]
- [25] Jiang Y J, Liang Y T, Li C M, et al. Crop rotations alter bacterial and fungal diversity in paddy soils across East Asia[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 95: 250-261.
- [26] Tan Z, Hurek T, Vinuesa P, et al. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(8): 3655-3664.
- [27] Holmes D E, Finneran K T, O'Neil R A, et al. Enrichment of members of the family Geobacteraceae associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium-contaminated aquifer sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(5): 2300-2306.
- [28] Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, et al. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5437-5447.
- [29] Petters S, Groß V, Söllinger A, et al. The soil microbial food web revisited: Predatory myxobacteria as keystone taxa?[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(9): 2665-2675.
- [30] Ding L J, An X L, Li S, et al. Nitrogen loss through anaerobic ammonium oxidation coupled to iron reduction from paddy soils in a chronosequence[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(18): 10641-10647.
- [31] Masuda Y, Itoh H, Shiratori Y, et al. Predominant but previously-overlooked prokaryotic drivers of reductive nitrogen transformation in paddy soils, revealed by metatranscriptomics[J]. *Microbes and Environments*, 2017, 32(2): 180-183.
- [32] Masuda Y, Yamanaka H, Xu Z X, et al. Diazotrophic *Anaeromyxobacter* isolates from soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(16): e00956-20.
- [33] Wang X J, Bei Q C, Liu G, et al. Microbial abundance and community composition in different types of paddy soils in China and their affecting factors[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58(3): 767-776. [王晓洁, 卑其成, 刘钢, 等. 不同类型水稻土微生物群落结构特征及其影响因素[J]. *土壤学报*, 2021, 58(3): 767-776.]
- [34] Liu Z W, Liu X X, Wu X L, et al. Long-term elevated CO₂ and warming enhance microbial necromass carbon accumulation in a paddy soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2021, 57(5): 673-684.

- [35] Hou L J, Wang R, Yin G Y, et al. Nitrogen fixation in the intertidal sediments of the Yangtze estuary: Occurrence and environmental implications[J]. Journal of Geophysical Research: Biogeosciences, 2018, 123(3): 936-944.
- [36] Xu M Y, He Z L, Deng Y, et al. Elevated CO₂ influences microbial carbon and nitrogen cycling[J]. BMC Microbiology, 2013, 13: 124.
- [37] Meiler S, Britten G L, Dutkiewicz S, et al. Constraining uncertainties of diazotroph biogeography from nifH gene abundance[J]. Limnology and Oceanography, 2022, 67(4): 816-829.

(责任编辑: 卢 萍)