

李永赞, 刘羽佳, 叶田会, 张静, 杨鹏, 余伟, 封俊, 闫芳芳, 张宗锦, 辜运富. 攀枝花不同海拔植烟土壤固氮细菌群落多样性与结构特征[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28 (6): 1452-1459

Li YY, Liu YJ, Ye TH, Zhang J, Yang P, Yu W, Feng J, Yan FF, Zhang ZJ. Diversity and structural characteristics of nitrogen-fixing bacterial community in tobacco-growing soils at different elevations in Panzhihua [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2022, 28 (6): 1452-1459

攀枝花不同海拔植烟土壤固氮细菌群落多样性与结构特征

李永赞¹ 刘羽佳² 叶田会³ 张静¹ 杨鹏³ 余伟³ 封俊³ 闫芳芳³ 张宗锦³
辜运富¹✉

¹四川农业大学资源学院 成都 611130

²四川农业大学风景园林学院 成都 611130

³四川省烟草公司攀枝花分公司 攀枝花 617099

摘要 固氮细菌在土壤氮素转换过程中发挥重要作用. 为深入认识攀枝花地区农田土壤固氮细菌群落特征及其与土壤理化性质的关联性, 以攀枝花米易县不同海拔高度 (1 600 m、1 800 m、2 000 m) 植烟土壤为研究对象, 采用高通量测序技术 (high-throughput sequencing) 对 *nifH* 基因进行测序, 分析固氮细菌群落结构特征和多样性. 结果显示, 固氮酶活性随海拔升高而逐渐降低, 并与土壤有机碳及全氮呈极显著正相关 ($P < 0.01$); 固氮细菌群落多样性指数在海拔 1 800 m 处达到最大值. 3 个海拔土壤共获得高质量序列 1 159 980 条, 所检测到的固氮细菌分属于 4 个门、11 个纲、19 个目、29 个科、40 个属. 基于门分类水平分析结果, 变形菌门 (Proteobacteria) 在所有海拔土壤中均为优势固氮菌群, 相对丰度达 64.69%-78.36%; 而蓝细菌门 (Cyanobacteria) 仅在海拔高度 2 000 m 时为优势类群. 在属水平上, 伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 相对丰度分别为海拔高度 1 800 m 与 2 000 m 土壤优势菌属, 而类伯克霍尔德氏菌属 (*Paraburkholderia*) 是所有海拔土壤中的主要菌属. 采用随机森林分析评估和筛选标志物种, 确认 *Azohydromonas* 对固氮细菌群落结构差异存在重要影响. 结合 Pearson 相关性分析与冗余分析结果, 土壤含水量、硝态氮、碱解氮与有效磷是造成不同海拔土壤固氮细菌群落特征差异的主要环境因子. 本研究表明海拔梯度及响应其变化的土壤理化因子, 对调控固氮细菌群落结构与多样性有较大影响. (图 8 表 3 参 41)

关键词 海拔梯度; 高通量测序; 土壤理化性质; *nifH* 基因; 多样性; 群落结构

Diversity and structural characteristics of nitrogen-fixing bacterial community in tobacco-growing soils at different elevations in Panzhihua

LI Yongyun¹, LIU Yujia², YE Tianhui³, ZHANG Jing¹, YANG Peng³, YU Wei³, FENG Jun³, YAN Fangfang³, ZHANG Zongjin³ & GU Yunfu¹✉

¹ College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

² College of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

³ Panzhihua Tobacco Company of Sichuan Province, Panzhihua 617099, China

Abstract The significance of nitrogen-fixing bacteria in the soil nitrogen cycle is critical. This study aimed to investigate the characteristics of the nitrogen-fixing bacterial community in farmland soil and its relationship with the soil physicochemical properties in the Panzhihua area of Sichuan, China. Tobacco planting soil at different altitudes (1 600 m, 1 800 m, and 2 000 m) in Miye County was used as the research object, and high-throughput sequencing of *nifH* gene was performed to reveal the community structure and diversity of nitrogen-fixing bacteria. The findings showed that nitrogenase activity gradually decreased with elevation and was strongly positively correlated with soil organic carbon and total nitrogen ($P < 0.01$), with the nitrogen-fixing bacterial community diversity reaching its maximum at an altitude of 1 800 m. A total of 1 159 980 high quality sequences of nitrogen-fixing bacteria were obtained from three elevations, belonging to 4 phyla, 11 classes, 19 orders, 29 families, and 40 genera. Proteobacteria were the dominant nitrogen-fixing bacteria at all elevations, whereas Cyanobacteria were the dominant group only at an elevation of 2 000 m. At the genus level, the relative abundance of *Burkholderia* and *Klebsiella* was the highest at 1 800 m and 2 000 m, respectively, while

收稿日期 Received: 2021-05-31 接受日期 Accepted: 2021-10-12

国家自然科学基金项目 (41201256) 和四川省烟草公司攀枝花分公司项目 (202051040024038, PZH2019003) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (41201256) and the Project of Panzhihua Branch of Sichuan Provincial Tobacco Company (202051040024038, PZH2019003)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: guyf@sicau.edu.cn)

Paraburkholderia were the dominant bacteria at all soil elevations. Random forest analysis was used to evaluate and screen marker species, confirming that *Azohydromonas* has an important influence on differences in the community structure of nitrogen-fixing bacteria. The results of Pearson correlation and redundancy analyses showed that soil moisture content, nitrate nitrogen, alkaline-hydrolyzable nitrogen, and available phosphorus were the key environmental factors that altered community features at different elevations. According to previous studies, the altitude gradient as well as the soil physicochemical properties that alter in reaction to it, has a greater impact on regulating the community structure and diversity of nitrogen-fixing bacteria.

Keywords elevation gradient; high-throughput sequencing; soil physicochemical property; *nifH* gene; diversity; community structure

土壤中的固氮微生物在全球氮素循环过程中至关重要，其固定的氮量是维持生态系统氮输入的最主要来源，已知的固氮微生物均归属原核生物界^[1]。固氮微生物在厌氧、低铵等特定的条件下，在细胞内固氮酶的作用下将空气中的氮气还原为铵以固定氮素，整个生物固氮过程由固氮还原酶和固氮酶组构的固氮酶复合物完成，其中固氮酶铁蛋白由*nifH*基因所编码，固氮酶则由*nifD*基因和*nifK*基因编码^[2]。*nifH*基因作为一种古老的功能基因，其数据信息丰富，序列高度保守，且存在可变区域，与16S rRNA基因的系统进化树结果相近，现为自然界固氮微生物研究中应用最为广泛的分子标记之一，固氮基因和固氮菌种群的多样性便可通过*nifH*测序进行评估^[3-5]。方宇等以紫云英化肥定位试验站水稻土壤为研究对象，通过分析土壤固氮菌细菌丰度和多样性变化情况，发现紫云英配施减量化肥有助于提升固氮细菌数量^[6]。刘璐等通过构建*nifH*基因克隆文库，经Venn图和Mantel相关性分析，发现固氮微生物多样性与植物群落结构之间呈高度正相关^[7]。Lee等采用高通量测序技术对Gotjawal森林土壤*nifH*细菌群落进行研究，发现固氮细菌群落组成受环境因子影响显著，群落装配与其他熔岩地区森林迥异^[8]。

攀枝花地区位于金沙江与雅砻江交汇处，作为四川传统烤烟栽培区域，具备对烤烟生长有利的光照、温度等气候因素长期，但由于长期不合理施用化肥，加之复杂地质、地形与显著分异的垂直气候影响，水土和养分流失现象严重，农田生态极为脆弱，当地烤烟种植产业的可持续发展面临严峻考验^[10]。固氮细菌群落动态特征一定程度上可以反映土壤氮素循环现状，可为攀枝花地区烤烟土壤生产力评价、区域环境变化预测提供参考^[11]。固氮细菌群落结构及多样性的变化主要由土壤理化性质所驱动，而区域内土壤理化性质受海拔高度以及土地管理措施等因素影响显著^[9]。海拔高度变化对水热条件重分配，影响植物生物量与化学元素组成，调节土壤有机质积累情况，改变矿质养分含量与形态，从而直接或间接引发土壤固氮细菌群落结构的时空异质性。当前还鲜见有关攀枝花地区不同海拔土壤固氮细菌多样性及其与环境因子关联的报道。

我们以攀枝花米易县不同海拔高度植烟土壤为研究对象，采用基于免培养的高通量测序技术分析固氮细菌群落多样性与结构，并通过Pearson相关性分析与冗余分析（RDA），客观认识该地区沿海拔梯度的土壤质量及微生态现状，以期揭示根际土壤固氮微生物的多样性及其与环境因子的关联，为改善农田土壤生态环境提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 采样地概况

攀枝花米易县（101°44'-102°15'E，26°42'-27°10'N）位于安宁河流域东面，县境东南部。该区域光热资源丰富，干湿季分明，中高山区雨季降水集中、雨量充沛，年平均气温为20.5℃，年平均日照时数2 700 h，年降雨量达1 100 mm，属典型南亚热带干热河谷气候，因其得天独厚的气候优势，是国内少有的烤烟生态最适宜区^[12]。

1.2 样品

土壤样品采集自米易县坪山乡3个海拔采样区（1 600 m、1 800 m、2 000 m），采样区烤烟品种为云烟87，植烟年限均在10年以上。农田土壤为渗育紫泥田土属。不同海拔土壤均为常规施肥，酒糟有机肥（有机质含量>45%，N+P+K>5%）750 kg/hm²+复合肥（N:P₂O₅:K₂O=12:12:25）750 kg/hm²。待烟叶采收后，避开施肥点，采用“S”形法，在3个采样区各设置6个样方，样方面积均为400 m²（20 m×20 m）。采用对角线五点取样法采集0-20 cm烤烟根际土样，并通过抖根法获得所需样品，去杂、研磨及过2 mm筛后，土样以无菌自封袋包装置于冰盒中，迅速带回实验室，保存于-80℃超低温冰箱，以进行后续DNA提取与*nifH*基因测序。土壤相关理化特性如表1所示，可知各样地土壤均呈酸性，海拔2 000 m土壤全碳含量显著高于海拔1 600 m与海拔1 800 m，海拔1 800 m处土壤硝态氮含量显著高于其余两个海拔。

1.3 固氮菌分离及固氮酶活性测定

固氮酶活性测定采用乙炔还原法进行测定^[13]。取相当于

表1 不同海拔土壤理化性质情况
Table 1 Soil physicochemical properties at different elevations

海拔 Elevations (h/m)	含水率 MC (w%)	pH	全碳 TC (w/g kg ⁻¹)	有机碳 SOC (w/g kg ⁻¹)	全氮 TN (w/g kg ⁻¹)	碱解氮 AN (w/mg kg ⁻¹)	有效磷 AP (w/mg kg ⁻¹)	速效钾 AK (w/mg kg ⁻¹)	NO ₃ ⁻ -N (w/mg kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ -N (w/mg kg ⁻¹)
1600	28.27±1.91a	5.54±0.04a	12.23±1.16b	34.15±2.13a	1.21±0.10a	59.27±5.71a	32.92±6.93a	141.91±14.56a	15.23±2.85b	23.90±2.39a
1800	29.66±2.81a	6.06±0.38a	7.67±1.08c	29.02±3.87ab	1.12±0.16a	62.77±7.42a	39.74±8.45a	99.50±20.47ab	28.60±2.01a	23.47±1.71a
2000	25.41±2.61a	5.79±0.23a	17.85±1.43a	23.57±2.43b	0.91±0.09b	49.47±5.89a	28.68±7.44a	68.25±6.99b	11.86±1.83b	22.82±4.19a

表中同列不同小写字母代表数据间存在显著差异（*P*>0.05）。
MC: Moisture content; TC: Total carbon; SOC: Soil organic carbon; TN: Total nitrogen; AN: Available nitrogen; AP: Available phosphorus; AK: Available potassium. The different lowercase letters in a column indicate significant differences among the data (*P*>0.05).

干重20 g新鲜土壤于100 mL血清瓶中, 橡皮塞密封, 抽出瓶中10 mL空气替换以等体积乙炔气体, 置于恒温培养箱中, 28 °C避光保温2 d, 瓶中乙烯含量通过气相色谱仪测定, 单位用 $\text{nmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ 表征^[14]。

1.4 土壤总DNA提取及*nifH*高通量测序

利用FastDNA® SPIN Kit for Soil试剂盒提取土壤总DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测, -20 °C保存。使用引物对*nifH-F* (5'-AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC-3')与*nifH-R* (5'-TTGTTSGCSCGRTACATSGCCATCAT-3')对*nifH*基因片段进行扩增^[15]。PCR反应体系: 包括5 × ExTaq缓冲液10 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL, 引物 (10 μmol/L) 各1 μL, ddH₂O补至50 μL。反应程序: 94 °C预变性3 min, 94 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 35个循环; 72 °C最终延伸10 min。样品送至上海派森诺生物科技股份有限公司, 借助Illumina MiSeq测序平台进行测序。

1.5 生物信息学分析

对原始序列使用QIIME1.9.0软件 (<http://qiime.org/>)^[16]进行质量控制。以97%为阈值, 使用Mothur 1.31.2软件 (<http://mothur.org/>)^[17]计算划分可操作分类单元 (operation taxonomic unit, OTU), 采用RDP classifier进行物种注释, 利用R语言pheatmap包绘制物种组成热图和随机森林分析热图。利用QIIME1.9.0软件计算Chao1、Shannon、Simpson以及Pielou指数。使用CANOCO5.0软件进行土壤环境参数与固氮菌群落特征的冗余分析 (redundancy analysis, RDA)。

2 结果与分析

2.1 土壤固氮酶活性与土壤理化性质的相关性

图1显示不同海拔固氮酶活性, 可知固氮酶活性变化范围为1.24-1.80 $\text{nmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$, 表现出随海拔高度上升而降低的规律, 且3个海拔高度间固氮酶活性彼此存在显著差异 ($P < 0.05$)。表2反映了固氮酶与土壤理化性质之间的相关性强弱, 可见固氮酶活性与土壤有机碳及全氮呈极显著正相关 ($P < 0.01$), 与全碳呈显著负相关 ($P < 0.05$), 与其余指标无相关性。

2.2 *nifH*高通量测序结果

从18个样品中共获得1 739 125条有效序列, 其中高质量序列1 159 980条。从低到高 (1 600 m、1 800 m、2 000 m), 5个海拔高度土壤中获得的高质量序列平均为 68 831、60 714与63 784条。各组样品测序覆盖度均在99.5%以上, Shannon-Wiener曲线趋向平缓, 表明测序满足深度要求, 可以反映样品中绝大多数物种信息 (图2)。以97%的阈值将高质量序列划分为1 464个OTUs。海拔1 600、1 800、2 000 m的OTUs数量分别为728、831个和641个。由图3可知, 海拔1 600 m土样特有OTUs 327个, 海拔1 800 m土样特有OTUs 393

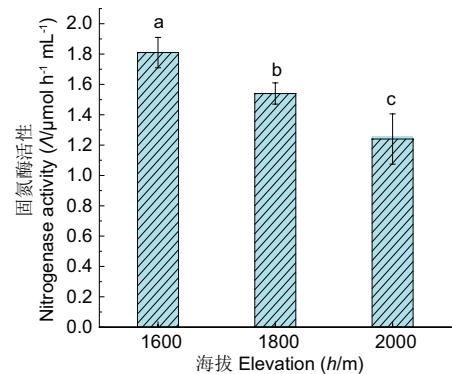


图1 不同海拔高度土壤固氮酶活性。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 1 Soil nitrogenase activities at different elevations. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

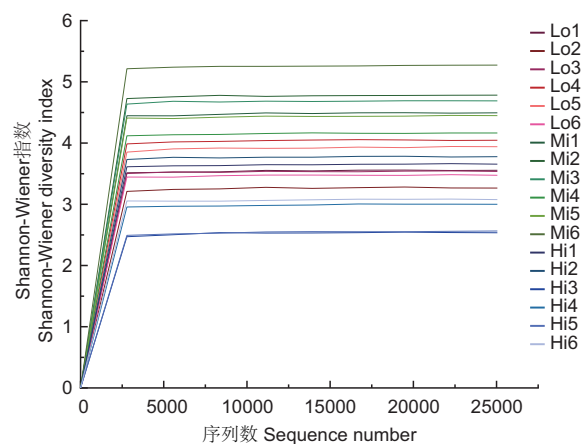


图2 基于Shannon-Wiener指数的物种多样性累计曲线。Lo: 1 600 m; Mi: 1 800 m; Hi: 2 000 m。

Fig. 2 The cumulative diversity curves of Shannon-Wiener diversity index. Lo: 1 600 m; Mi: 1 800 m; Hi: 2 000 m.

个, 海拔2 000 m土样特有OTUs 265个, 3个海拔共有OTUs数目为257个, 占OTUs总数的17.55%。1 464个OTUs分属于4个门、11个纲、19个目、29个科、40个属。

表3反映各海拔固氮细菌群落多样性指数。海拔1 800 m土壤Chao1指数与Shannon-Wiener指数最大, 且显著高于海拔1 600 m与海拔2 000 m土壤 ($P < 0.05$); 海拔1 800 m土壤Simpson指数显著高于海拔2 000 m土壤; 关于Pielou指数, 海拔1 800 m (海拔1 600 m (海拔2 000 m, 且不同海拔彼此存在显著差异 ($P < 0.05$)). 可见多样性指数变化趋势一致, 随海拔升高先增加后降低, 表明固氮细菌群落多样性在中海拔 (1 800 m) 时, 多样性、丰富度与均匀度指数均达到最大值, 物种多样性最为丰富。

2.3 固氮细菌群落结构

从门分类水平分析, 由图4A得知, 4个菌门分别为变形

表2 固氮酶活性与土壤理化性质的相关性

Table 2 Correlation between nitrogenase activity and soil physicochemical properties

理化指标 Physicochemical property	pH	有机碳 SOC	含水率 MC	全氮 TN	碱解氮 AN	有效磷 AP	速效钾 AK	全碳 TC	NO ₃ ⁻ -N	NH ₄ ⁺ -N
固氮酶活性 Nitrogenase activity	-0.333	0.717**	0.295	0.643**	0.341	-0.448	0.544	-0.470*	0.164	0.141

*和**分别表示在0.05和0.01水平上显著相关。

SOC: Soil organic carbon; MC: Moisture content; TN: Total nitrogen; AN: Available nitrogen; AP: Available phosphorus; AK: Available potassium; TC: Total carbon. * and ** represent significant differences among the treatments at the 0.05 and 0.01 levels, respectively.

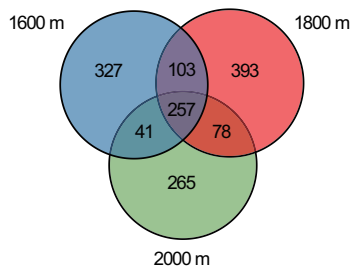


图3 不同海拔土样OTUs分布Venn图。
Fig. 3 Venn diagrams of soil samples OTUs distribution at different elevations.

菌门 (Proteobacteria)、蓝细菌门 (Cyanobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 与放线菌门 (Actinobacteria)。变形菌门在3个海拔高度土壤中均为优势类群, 随海拔高度上升, 相对丰度分别为74.92%、78.36%与64.69%; 蓝细菌门相对丰度随海拔梯度升高呈现先降低后上升趋势, 分别为11.58%、8.62%与29.41%; 放线菌门相对丰度随海拔上升呈降低趋势, 在海拔2 000 m时仅为0.21%; 厚壁菌门相对丰度在不同海拔间变化并不明显。从属分类水平分析, 选取丰度前15位菌属制作堆叠图。由图4B可知, 海拔1 600 m土壤中, 伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia*)、类伯克霍尔德菌属 (*Paraburkholderia*)、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、斯科曼氏球菌属 (*Skermanella*)、地杆菌属 (*Geobacter*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、弗兰克菌属 (*Frankia*) 与 *Azohydromonas* 为优势类群, 相对丰度范围介于6.04%-7.87%间, 除弗兰克菌属归属于放线菌门外, 其余优势菌属均归属于变形菌门。海拔1 800 m土壤中, 伯克霍尔德菌属、类伯克霍尔德菌属与来自厚壁菌门的类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*) 为优势菌属, 其中, 伯克霍尔德菌属相对丰度达22.20%。海拔2 000 m土壤中, 类伯克霍尔德菌属、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 与慢生根瘤菌属为优势类群, 相对丰度分别为13.66%、18.58%与8.88%。克雷伯氏菌属在海拔2 000

m处相对丰度大幅提升。类伯克霍尔德菌属在3个海拔高度土壤中均为优势类群, 且相对丰度随海拔上升而提升。

通过随机森林分析, 筛选出对不同海拔土壤固氮细菌群落结构差异有显著影响的标志物种。图5中选取了重要度前20位的菌属进行分析, 由重要度分值排序可知隶属变形菌门的 *Azohydromonas* 分值最高, 为0.083, 其在海拔1 600 m土壤中的丰度显著高于其余两个海拔。

2.4 土壤理化性质对固氮细菌群落多样性及结构的影响

图6中Pearson相关性热图揭示土壤环境因子与固氮细菌群落多样性之间的关联性, 硝态氮含量与Chao1指数、Shannon-Wiener指数及pielou指数均呈极显著正相关 ($P < 0.01$); 有效磷、总碳含量与各项 α 多样性指数均呈显著负相关 ($P < 0.05$); pH与各项多样性指数呈正相关, 但均未达到显著水平。

固氮细菌菌门及优势菌属 (前10菌属) 与土壤理化因子的Pearson相关性分析结果见图7。在门水平上 (图7A), 放线菌门 (*Actinobacteria*) 与全氮呈显著正相关; 蓝细菌门 (*Cyanobacteria*) 与有效磷及总碳呈显著正相关, 与速效钾呈显著负相关; 聚类结果表明, 蓝细菌门较放线菌门、变形菌门 (*Proteobacteria*) 及厚壁菌门 (*Firmicutes*), 对土壤理化性质所响应的差异较大。在图7B中, *Azohydromonas* 与有机碳呈显著正相关; 弗兰克菌属 (*Frankia*) 与总氮呈显著正相关; 脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*) 与总氮及速效钾呈显著正相关; 慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 与pH及硝态氮呈显著负相关; 克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 与土壤含水量呈显著负相关。图8用于进一步探究土壤理化因子对固氮细菌群落结构的影响。由图8A可知, 基于门水平RDA分析第一排序轴与第二排序轴分别为36.90%和24.57%, 总解释率为61.47%, 有效磷 ($F = 2.4, P < 0.05$) 对固氮细菌群落结构有显著影响, 蓝细菌门及变形菌门动态关联紧密, 与放线菌门和厚壁菌门呈负相关, 与土壤理化因子中的有效磷、总碳及pH正相关。图8B中RDA

表3 不同海拔高度土壤固氮细菌群落 α 多样性
Table 3 Alpha-diversity of soil nitrogen-fixing bacteria communities at different altitudes

海拔 Elevation	Chao1指数 Chao1 index	香农-威纳指数 Shannon-Wiener index	辛普森指数 Simpson index	Pielou指数 Pielou index	覆盖度 Coverage (r1%)
1600	380.59 ± 14.52b	3.63 ± 0.29b	0.85 ± 0.06ab	0.46 ± 0.02b	0.996
1800	516.14 ± 31.47a	4.64 ± 0.38a	0.87 ± 0.07a	0.53 ± 0.09a	0.995
2000	380.04 ± 53.30b	3.10 ± 0.53b	0.76 ± 0.07b	0.37 ± 0.04c	0.996

同一列不同小写字母表示不同处理差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters within the same column indicate significant differences among different treatments ($P < 0.05$).

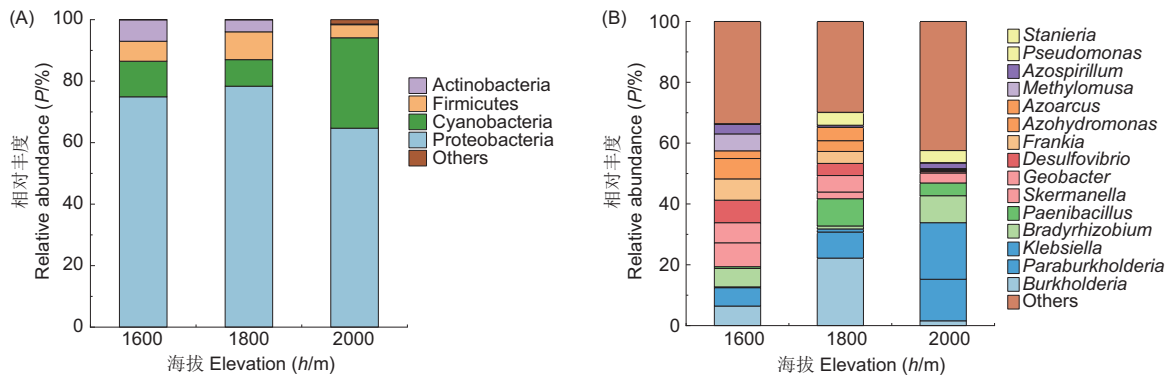


图4 不同海拔高度基于门 (A) 与属 (B) 水平的固氮细菌群落组成。
Fig. 4 Nitrogen-fixing bacterial community composition based on phylum (A) and genus (B) levels at different elevations.

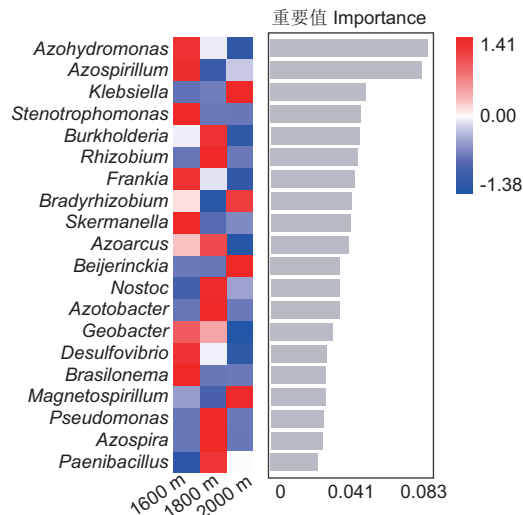


图5 不同海拔土壤固氮细菌群落随机森林分析。左侧热图表示物种丰度分布情况，右侧柱状图为每个标志物种重要度分值排序。

Fig. 5 Random forest analysis of soil nitrogen-fixing bacteria communities at different elevations. The heatmap on the left illustrates the distribution of species abundance, while the histogram on the right ranks the importance scores of each marker species.

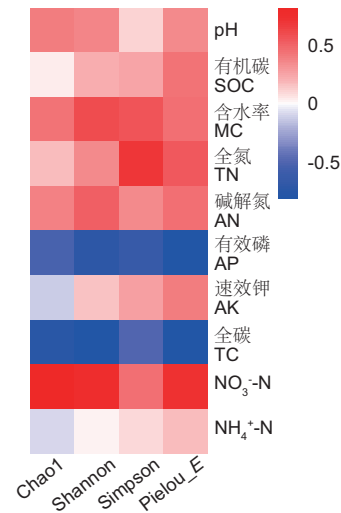


图6 土壤理化因子与固氮细菌群落多样性指数相关性分析热图。

Fig. 6 Heatmap of correlation analysis between soil physicochemical properties and nitrogen-fixing bacterial community diversity index. SOC: Soil organic carbon; MC: Moisture content; TN: Total nitrogen; AN: Available nitrogen; AP: Available phosphorus; AK: Available potassium; TC: Total carbon. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

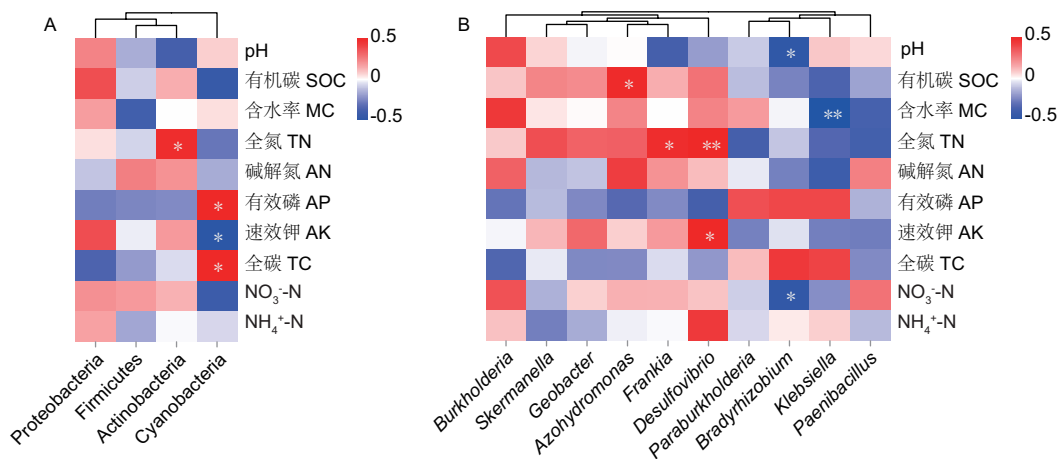


图7 土壤理化性质与固氮细菌群落相对丰度相关性分析热图。

Fig. 7 Heatmap of correlation analysis between soil physicochemical properties and relative abundance of soil nitrogen-fixing bacteria. SOC: Soil organic carbon; MC: Moisture content; TN: Total nitrogen; AN: Available nitrogen; AP: Available phosphorus; AK: Available potassium; TC: Total carbon. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

分析结果显示，前两轴解释率分别为24.99%与12.40%，总共可解释优势菌属分布趋势的37.39%，土壤含水量 ($F = 2.2$, $P < 0.05$)、碱解氮 ($F = 1.9$, $P < 0.05$) 对优势菌属影响显著。斯科曼氏球菌属、地杆菌属及脱硫弧菌属与速效钾正相关；克雷伯氏菌属与慢生根瘤菌属分布于有效磷、总碳含量高的区域；伯克霍尔德菌属、类伯克霍尔德菌属及 *Azohydromonas* 与碱解氮、硝态氮、pH、含水量及土壤有机碳呈正相关，且根据箭头投影长度可知伯克霍尔德菌属受上述环境因子的影响最大；而类芽孢杆菌属与全氮呈负相关。

3 讨论

前人研究表明海拔高度变化并不直接参与对土壤细菌群落结构的调控，而是通过多种气候要素驱动土壤理化性质变化，进而影响细菌群落特征以及相关酶活性^[18]。参照庞凤等构

建的四川省烟区土壤肥力评价体系，按肥力递减次序将相关肥力指标分为I、II、III这3个层次，本研究中3个海拔高度土样的pH、全氮、碱解氮等主要化学指标都为III级，仅有效磷含量处于较高水平，即研究区土壤整体肥力在省内烟区中处于较低水平，尤以海拔2 000 m土壤速效性养分最为缺乏^[20]。温度随海拔梯度上升而降低，土壤微生物碳、氮代谢活动受到抑制，故存留于高海拔土壤中的总碳含量高；但针对农田生态系统，在海拔较低的区域更利于浇灌、翻耕等人为措施，输入土壤中的有机碳含量远超过进入大气的损失量，因而有机碳含量更高^[19]。本研究中固氮酶活性与土壤有机碳、全氮显著正相关。Reed等认为植物地上部凋落物持续向土壤输入有机碳，刺激固氮微生物代谢活动，增强土壤固氮酶活性，从而维持高氮固定率；而有机碳分解受C/N比影响，以微生物为媒介，土壤有机碳与全氮含量实现动态平衡^[21-23]。

本研究中固氮微生物群落多样性表现出一定垂直变异性

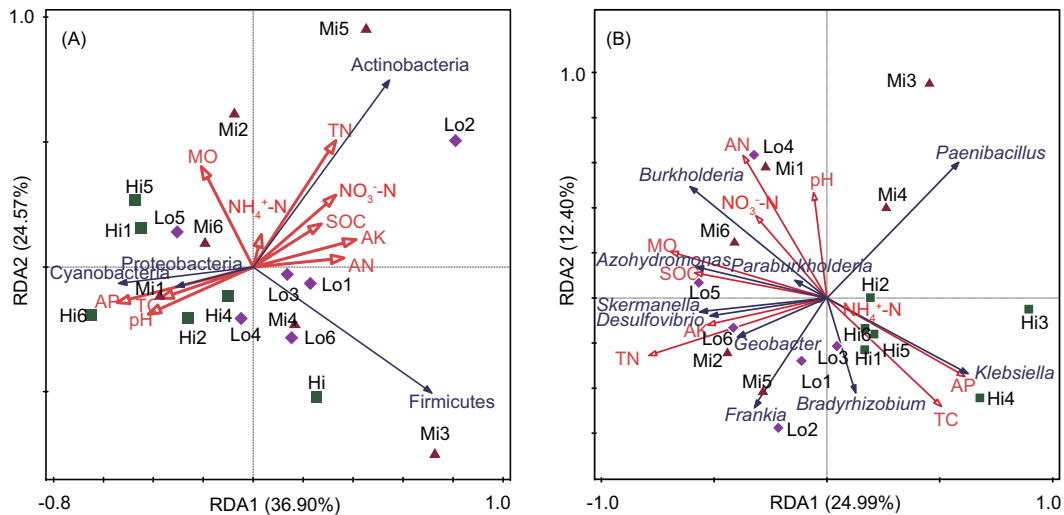


图8 基于门(A)与属(B)水平固氮细菌与土壤理化因子的冗余分析。Lo: 1 600 m; Mi: 1 800 m; Hi: 2 000 m。SOC: 土壤有机碳; MC: 含水量; TN: 总氮; AN: 碱解氮; AP: 有效磷; AK: 速效钾; TC: 总碳。

Fig. 8 Redundancy analysis between the soil nitrogen-fixing bacteria and soil physicochemical properties based on phylum (A) and genus (B) levels. Lo: 1 600 m; Mi: 1 800 m; Hi: 2 000 m. SOC: Soil organic carbon; MO: Moisture content; TN: Total nitrogen; AN: Alkali hydrolyzed nitrogen; AP: Available phosphorus; AK: Available potassium; TC: Total carbon.

(表3), 海拔1 800 m土壤的 α 多样性指数最高, 海拔2 000 m处多样性最低。图5相关性热图结果显示多样性指数受土壤含水量、硝态氮、有效磷及总碳影响显著。杨宇等以丘陵坡地紫色土为研究对象, 发现土壤含水量与微生物群落多样性关联度高^[24]; 李东坡等认为土壤含水量不仅直接作用于微生物, 还可通过促进地上部生物量及土壤碳氮循环, 提高土壤酶活性, 进而对微生物群落结构产生积极影响^[25]。方宇等发现水稻土固氮菌丰度与硝态氮呈正相关^[6], Yu等也认为硝态氮含量为固氮菌群多样性变化的主要动力之一^[26], 这可能是外源硝态氮的输入改善根际微域环境, 辅之以良好水分条件, 促进固氮微生物生长^[27]。土壤有效磷与多样性指数均呈显著或极显著负相关, 表明其含量的提升对固氮细菌群落多样性有不利影响, 在有效磷含量处于较高水平时, 促进土壤微生物代谢活动, 固氮细菌与非固氮微生物间的生存竞争加剧。

变形菌门在不同海拔均占据优势地位, 其广泛分布在各类生态系统, 对于速效养分有较高需求, 在高海拔相对丰度下降, 推测是对低肥力水平的响应程度较其他菌门更大^[28]; 蓝细菌门多数类群未定义到属水平, 关于蓝细菌固氮能力强弱学界尚存在分歧, 荆瑞勇等认为部分蓝细菌的固氮作用对提高稻田土壤肥力方面发挥较大作用^[29]。本研究土壤有效磷是门水平上影响固氮细菌群落分布的重要因素, Xun等认为土壤有效磷含量对不同固氮微生物的固氮潜力, 有不同程度调控作用, 从而驱动固氮微生物群落结构变异^[30]。海拔2 000 m土壤固氮细菌群落组成情况与海拔1 600 m与海拔1 800 m土壤差异较大, 优势菌属间相对丰度相差较大, 可能是海拔2 000 m植烟土壤氮素水平低于其余两个海拔土壤所致, 于树等研究发现增施氮肥土壤中没有明显细菌优势种群, 表明施加氮肥能够调控物种竞争力, 使菌群结构维持相对平衡^[31]。克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)在海拔2 000 m处的相对丰度明显高于其他海拔, 表明其对不利环境因素的耐受能力较强, 与本研究结果相近, Tai等仅在养分贫瘠的两个高海拔采样点土样中检测到该菌属, 并认为作物可能通过促进某些固氮类群的适应度, 以影响氮循环过程^[32]; 类伯克霍尔德氏

菌属(*Paraburkholderia*)在不同海拔土壤中均为优势类群, 其部分种通过联合固氮方式促进多种禾本科作物生长, 在国外作为生物固氮资源被广泛应用于农业生产^[33]。通过随机森林分析, 可知*Azohydromonas*差异物种重要度最高, 当前对*Azohydromonas*的研究主要集中在环境修复领域, 对于其在氮循环方面的角色还有待进一步探究^[34]。

本研究发现碱解氮对于群落结构有显著影响, 与前人研究结果一致, 有学者认为碱解氮能够刺激部分菌门生长, 从而调节固氮细菌群落结构^[35-36]。慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)相对丰度与pH及土壤硝态氮呈负显著相关。硝态氮对慢生根瘤菌及自身固氮酶活性有抑制作用, 以削弱其竞争优势; 慢生根瘤菌相对丰度随土壤酸碱度降低而增加, 主要是由于慢生根瘤菌具备分泌碱性物质以耐受低pH胁迫的生理机制, 此外, 慢生根瘤菌体内*hemaA*基因的表达与土壤有效铁呈正相关, 土壤酸碱度上升后, *hemaA*基因表达受抑制进而影响慢生根瘤菌血红素合成^[37-39]。慢生根瘤菌属长期被认为仅在豆科作物根瘤中才能进行固氮作用, 非共生状态下仅以腐生菌身份活动, 但新的研究成果表明该属许多成员可在非共生状态下固氮, 为这种重要的生物资源应用于非豆科作物提供理论支撑^[40]。类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)与其余菌属呈负相关, 表明其与其他菌属间存在较强竞争关系。弗兰克菌属(*Frankia*)是本次研究中唯一属于放线菌门的优势菌属, 与土壤硝态氮含量呈正相关, Lin等也发现仅在总氮和硝态氮均处于高含量的NPM处理出现了弗兰克菌属^[37]。RDA分析前两轴总解释率为37.39%, 故属水平上的固氮细菌群落变异可能不仅受土壤理化指标影响, 鉴于烤烟根际环境复杂性, 因此细菌群落还可能受微域气候、地上部植被、根系分泌物等多种因素耦合影响^[41]。

4 结论

本研究发现高浓度有效磷含量对不同海拔土壤固氮细菌群落均有显著的不利影响, 海拔2 000 m植烟土壤固氮细菌群落结构简单化趋势尤为明显, 主因可能是近年来攀枝花地区

强调重施磷肥、减施氮肥,氮素养分极度缺乏。因此针对攀枝花地区不同海拔土壤情况,应调整施肥配方与管理措施,同时减轻因暴雨导致的土壤氮素迁移与淋失。此外,由于固氮微生物群落受复杂的生物与非生物因素机制调控,故而在今后研究中可考虑植物影响,更多关注和多维度研究根系-土壤-微域气候综合体。

物群落受复杂的生物与非生物因素机制调控,故而在今后研究中可考虑植物影响,更多关注和多维度研究根系-土壤-微域气候综合体。

参考文献 [References]

- Dixon R, Kahn D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2004, **2** (8): 621-631
- 陈清华, 韩云蕾, 马尧, 燕永亮, 平淑珍, 陆伟. 生物固氮基因簇结构与进化研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, **15** (4): 129-138 [Chen QH, Han YL, Ma Y, Yan YL, Ping SZ, Lu W. Research progress on structure and evolution of biological nitrogen-fixation gene cluster [J]. *J Agric Sci Technol*, 2013, **15** (4): 129-138]
- Gaby JC, Rishishwar L, Valderrama-Aguirre LC, Green SJ, Valderrama-Aguirre A, Jordan IK, Kostka JE. Diazotroph community characterization via a high-throughput *nifH* amplicon sequencing and analysis pipeline [J]. *Appl Environ Microb*, 2018, **84** (4): 1512-1517
- Su ZC, Zhang HW, Li XY, Zhang Q, Zhang CG. Toxic effects of acetochlor, methamidophos and their combination on *nifH* gene in soil [J]. *J Environ Sci*, 2007, **19** (7): 864-873
- Mus F, Crook MB, Garcia K, Garcia Costas A, Geddes BA, Kouri ED, Paramasivan P, Ryu MH, Oldroyd GE, Poole PS, Udvardi MK. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes [J]. *Appl Environ Microb*, 2016, **82** (13): 3698-3710
- 方宇, 王飞, 贾宪波, 林陈强, 张慧, 陈龙军, 陈济琛. 绿肥配施减量化肥对土壤固氮菌群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2018, **37** (9): 1933-1941 [Fang Y, Wang F, Jia XB, Lin CQ, Zhang H, Chen LJ, Chen JC. Effect of green manure and reduced chemical fertilizer load on the community of soil nitrogen-fixing bacteria [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2018, **37** (9): 1933-1941]
- 刘璐, 何寻阳, 杜虎, 王克林. 喀斯特土壤固氮微生物群落与植被、土壤的关系[J]. 生态学报, 2017, **37** (12): 4037-4044 [Liu L, He XY, Du H, Wang KL. The relationships among nitrogen-fixing microbial communities, plant communities, and soil properties in karst regions [J]. *Acta Ecol Sin*, 2017, **37** (12): 4037-4044]
- Lee TK, Han II, Kim MS, Seong HJ, Kim JS, Sul WJ. Characterization of a *nifH*-harboring bacterial community in the soil-limited gotjawal forest [J]. *Front Microbiol*, 2019, **10**: 1858
- Poly F, Ranjard L, Nazaret S, Gourbiere F, Monrozier JL. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** (5): 2255-2262
- 吴彦, 吴宁, 和献锋, 蒋祺, 李恒, 卢涛. 攀枝花地区麻疯树人工林群落土壤特性[J]. 长江流域资源与环境, 2008, **17** (S1): 54-59 [Wu Y, Wu N, He XF, Jiang Q, Li H, Lu T. Analysis of traits of soil under *jatropha curcas* plantation in Panzhihua, China [J]. *Resour Environ Yangtze Basin*, 2008, **17** (S1): 54-59]
- 张晶, 张惠文, 李新宇, 苏振成, 张成刚. 土壤微生物生态过程与微生物功能基因多样性[J]. 应用生态学报, 2006, **17** (6): 1129-1132 [Zhang J, Zhang HW, Li XY, Su ZC, Zhang CG. Soil microbial ecological process and microbial functional gene diversity [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2006, **17** (6): 1129-1132]
- 张建平, 刘淑珍. 金沙江干热河谷区攀枝花市土地退化初探[J]. 中国沙漠, 1998, **18** (2): 149-153 [Zhang JP, Liu SZ. A preliminary study on land degradation in Panzhihua city on Jinsha River dry-hot valley area [J]. *J Desert Res*, 1998, **18** (2): 149-153]
- Zheng JQ, Han SJ, Ren FR, Zhou YM, Zhang Y. Effects of long-term elevated CO₂ on N₂-fixing, denitrifying and nitrifying enzyme activities in forest soils under *Pinus sylvestris* in Changbai Mountain [J]. *J For Res*, 2008, **19** (4): 283-287
- 靳振江, 潘根兴, 刘晓雨. 太湖地区长期不同施肥水稻土N₂和CO₂固定细菌群落结构的特征与差异[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, **19** (1): 82-92 [Jin ZJ, Pan GX, Liu XY, Li LQ. Community structure characters and differences of N₂-fixing and CO₂-fixing bacteria under long-term fertilization in paddy soils of Taihu Lake region, China [J]. *J Plant Nutr Fert*, 2013, **19** (1): 82-92]
- Rösch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil [J]. *Appl Environ Microb*, 2002, **68** (8): 3818-3829
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JL. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nat Methods*, 2010, **7** (5): 335-336
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks D, Robinson CJ. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Appl Environ Microb*, 2009, **75** (23): 7537-7541
- Klimek B, Jawa M, Choczyński M, Stolarczyk M, Niklińska M. The drivers of soil microbial communities structure on forest stands along the altitudinal gradient in western carpathians [J]. *Acta Oecol*, 2020, **108**: 103643
- 庞凤, 陶晓秋, 黄玫, 叶利华, 张海燕, 杨雪, 韶济明. 四川省植烟区土壤肥力评价[J]. 中国烟草科学, 2013, **34** (1): 40-44 [Pang S, Tao XQ, Huang M, Ye LH, Zhang HY, Yang X, Shao JM. Evaluation on soil fertility in Sichuan tobacco planting areas [J]. *Chin Tob Sci*, 2013, **34** (1): 40-44]
- Powers RF, Scott DA, Sanchez FG, Voldseth RA, Page-Dumroese D, Elioff JD, Stone DM. The north American long-term soil productivity experiment: findings from the first decade of research [J]. *For Ecol Manag*, 2005, **220** (1-3): 31-50
- Reed SC, Cleveland CC, Townsend AR. Controls over leaf litter and soil nitrogen fixation in two lowland tropical rain forests [J]. *Biotropica*, 2007, **39** (5): 585-592
- 方晰, 田大伦, 项文化, 雷丕锋. 杉木人工林土壤有机碳的垂直分布特征[J]. 浙江农林大学学报, 2004, **21** (4): 60-65 [Fang X, Tian DL, Xiang WH, Lei PF. Vertical distribution of soil organic carbon in *Cunninghamia lanceolata* plantation [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2004, **21** (4): 60-65]
- 廖利平, 高洪, 汪思龙, 马越强, 黄志群, 于小军. 外加氮源对杉木凋落物分解及土壤养分淋失的影响[J]. 植物生态学报, 2000, **24** (1): 34-39 [Liao LP, Gao H, Wang SL, Ma YQ, Huang ZQ, Yu XJ. The effect of nitrogen addition on soil nutrient leaching and the decomposition of Chinese fir leaf litter [J]. *Chin J Plant Ecol*, 2000,

- 24 (1): 34-39]
- 24 文东新, 杨宁, 杨满元. 衡阳紫色土丘陵坡地植被恢复对土壤微生物功能多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2016, **27** (8): 2645-2654 [Wen DX, Yang N, Yang MY. Effects of re-vegetation on soil microbial functional diversity in purple soils at different re-vegetation stages on sloping-land in Hengyang, Hunan Province, China [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2016, **27** (8): 2645-2654]
- 25 李东坡, 陈利军, 武志杰, 朱平, 任军, 梁成华, 彭畅, 高红军. 不同施肥黑土微生物量氮变化特征及相关因素[J]. 应用生态学报, 2004, **15** (10): 1891-1896 [Li DP, Chen LJ, Wu ZJ, Zhu P, Ren J, Liang CH, Peng C, Gao HJ. Dynamics of microbial biomass N in different fertilized black soil and its related factors [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2004, **15** (10): 1891-1896]
- 26 Yu FM, Lin JM, Xie DY, Yao YW, Wang XR, Huang YY, Xin MF, Yang FF, Liu KH, Li Y. Soil properties and heavy metal concentrations affect the composition and diversity of the diazotrophs communities associated with different land use types in a mining area [J]. *Appl Soil Ecology*, 2020, **155**: 103669
- 27 张慧敏, 李希来, 杨帆. 增温和氮添加对高寒草甸土壤微生物氮素生理群的影响[J]. 草地学报, 2020, **28** (3): 606-612 [Zhang HM, Li XL, Yang F. Effects of warming and nitrogen fertilization on soil microbial nitrogen physiology groups in alpine meadow [J]. *Acta Agrestia Sin*, 2020, **28** (3): 606-612]
- 28 Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. Toward an ecological classification of soil bacteria [J]. *Ecology*, 2007, **88** (6): 1354-1364.
- 29 荆瑞勇, 王丽艳, 孙强, 刘俊杰, 刘居东, 金剑, 刘晓冰, 王光华. 东北旱田土壤中 *Anabaena* 伴生细菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2020, **47** (1): 130-139 [Jing RY, Wang LY, Sun Q, Liu JJ, Liu JD, Jin J, Liu XB, Wang GH. Isolation and identification of bacteria associated with *Anabaena* from upland soils in northeast China [J]. *Microbiol China*, 2020, **47** (1): 130-139]
- 30 Xun W, Li W, Huang T, Ren Y, Xiong W, Miao YZ, Ran W, Li DC, Shen QR, Zhang RF. Long-term agronomic practices alter the composition of asymbiotic diazotrophic bacterial community and their nitrogen fixation genes in an acidic red soil [J]. *Biol Fert Soils*, 2018, **54** (3): 329-339
- 31 于树, 汪景宽, 李双昇. 应用PLFA方法分析长期不同施肥处理对玉米地土壤微生物群落结构的影响[J]. 生态学报, 2008 (9): 4221-4227 [Yu S, Wang JK, Li SY. Effect of long-term fertilization on soil microbial community structure in corn field with the method of PLFA [J]. *Acta Ecol Sin*, 2008 (9): 4221-4227]
- 32 Tai XS, Mao WL, Liu GX, Chen T, Zhang W, Wu XK, Long HZ, Zhang BG, Zhang Y. High diversity of nitrogen-fixing bacteria in the upper reaches of the Heihe River, northwestern China [J]. *Biogeosciences*, 2013, **10** (8): 5589-5600
- 33 Kuramae EE, Derksen S, Schlemper TR, Dimitrov MR, Costa OY, da Silveira AP. Sorghum growth promotion by *Paraburkholderia tropica* and *Herbaspirillum frisingense*: putative mechanisms revealed by genomics and metagenomics [J]. *Microorganisms*, 2020, **8** (5): 725.
- 34 Lladó S, Jiménez N, Viñas M, Solanas AM. Microbial populations related to PAH biodegradation in an aged biostimulated creosote-contaminated soil [J]. *Biodegradation*, 2009, **20** (5): 593-601
- 35 赵辉, 周运超. 不同母岩发育马尾松土壤固氮菌群落结构和丰度特征[J]. 生态学报, 2020, **40** (17): 6189-6201 [Zhao H, Zhou YC. Characteristics of structure and abundance of the nitrogen-fixing bacterial community in *Pinus massoniana* soil developed from different parent rocks [J]. *Acta Ecol Sin*, 2020, **40** (17): 6189-6201]
- 36 李明, 张俊华. 不同施肥模式对盐碱化稻作土壤细菌群落的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2018, **36** (5): 142-148 [LI Ming, ZHANG Jun-hua. Effects of different fertilization patterns on the bacterial community dynamic in saline-alkali paddy soil [J]. *Agric Res Arid Areas*, 2018, **36** (5): 142-148]
- 37 Lin YX, Ye GP, Liu DY, Ledgard S, Luo JF, Fan JB, Yuan JJ, Chen ZM, Ding WX. Long-term application of lime or pig manure rather than plant residues suppressed diazotroph abundance and diversity and altered community structure in an acidic Ultisol. *Soil Biol Biochem*, 2018, **123**: 218-228
- 38 Fujihara S. Biogenic amines in rhizobia and legume root nodules [J]. *Microbes Environ*, 2009, **24** (1): 1
- 39 Page KM, Connolly EL, Gueriot ML. Effect of iron availability on expression of the *Bradyrhizobium japonicum hema* gene [J]. *J Bacteriol*, 1994, **176** (5): 1535-1535
- 40 Hara S, Morikawa T, Wasai S, Kasahara Y, Koshiba T, Yamazaki K, Fujiwara T, Tokunaga T, Minamisawa K. Identification of nitrogen-fixing *Bradyrhizobium* associated with roots of field-grown sorghum by metagenome and proteome analyses [J]. *Front Microbial*, 2019, **10**: 407
- 41 Li XL, Penttinen P, Gu YF, Zhang XP. Diversity of *nifH* gene in rhizosphere and non-rhizosphere soil of tobacco in Panzhuhua, China [J]. *Ann Microbiol*. 2012, **62** (3): 995-1001