

DOI:10.12171/j.1000-1522.20240202

## 荒漠灌木林土壤 *nifH* 基因丰度及固氮微生物群落组成特征

代金霞 姚佳妮 刘爽 苏建宇 张钧杰  
(宁夏大学生命科学学院, 宁夏银川 750021)

**摘要:**【目的】从群落水平探究荒漠豆科灌木林地土壤固氮微生物多样性、群落结构组成及其环境影响因素。【方法】采用荧光定量 PCR 和 Illumina 高通量测序方法, 研究宁夏荒漠草原 4 种典型豆科灌木林地(沙冬青、猫头刺、柠条和毛刺)土壤中 *nifH* 基因丰度、固氮微生物多样性和群落结构组成, 采用 Pearson 相关性分析和冗余分析等方法进行环境因子关联分析。【结果】(1)4 种灌木林地土壤中 *nifH* 基因丰度存在差异, 柠条林地土壤中 *nifH* 丰度显著高于沙冬青、猫头刺和毛刺林地( $P < 0.05$ ); 固氮微生物群落丰富度表现为柠条和沙冬青林地显著高于毛刺和猫头刺林地( $P < 0.05$ ), 群落多样性表现为柠条林地显著高于沙冬青林地( $P < 0.05$ ), 而毛刺、猫头刺和沙冬青林地固氮微生物群落多样性差异不显著。(2)4 种林地中检测到的固氮微生物分布在 5 门 15 科 19 属。变形菌门为绝对优势类群, 相对丰度在 91.13%~97.79% 之间; 红螺菌科为共有优势科, 占 59.56%~79.68%; 属水平上, 斯科曼氏菌属、固氮螺菌属和固氮氢自养单胞菌属是共有优势属; 沙冬青林地固氮微生物组成与其他 3 种林地差别较大, 有大量固氮菌属分布(占 25.09%)。(3)相关性分析表明, 固氮微生物 *nifH* 基因丰度、丰富度指数和  $\beta$  多样性与土壤 pH 显著正相关。土壤速效磷、速效钾、pH、全氮和全磷显著影响固氮微生物群落组成。【结论】柠条林地 *nifH* 基因丰度、固氮微生物丰富度和多样性均高于其他灌木林地, 其土壤微生物功能群落具备更强的氮素积累和转化能力。

**关键词:** 根际土壤; *nifH* 基因; 固氮微生物; 群落组成

中图分类号: S793.3; Q938.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2024)11-0043-10

引文格式: 代金霞, 姚佳妮, 刘爽, 等. 荒漠灌木林土壤 *nifH* 基因丰度及固氮微生物群落组成特征 [J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(11): 43-52. Dai Jinxia, Yao Jiani, Liu Shuang, et al. Abundance of *nifH* gene and nitrogen-fixing microbial community composition characteristics in desert scrubland soil [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(11): 43-52.

### Abundance of *nifH* gene and nitrogen-fixing microbial community composition characteristics in desert scrubland soil

Dai Jinxia Yao Jiani Liu Shuang Su Jianyu Zhang Junjie  
(School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China)

**Abstract:** [Objective] This paper explores the diversity of soil nitrogen-fixing microorganisms, community structure composition, and environmental influencing factors in desert leguminous scrubland at the community level. [Method] Fluorescence quantitative PCR and Illumina high-throughput sequencing methods were used to study the abundance of *nifH* gene, nitrogen-fixing microbial diversity and community composition in soils of four typical legume scrubland (*Ammopiptanthus mongolicus*, *Oxytropis aciphylla*, *Caragana korshinskii*, and *Caragana tibetica*) in Ningxia desert grassland of northwestern China. Pearson correlation analysis and redundancy analysis were used for environmental factor correlation analysis. [Result] (1) There were differences in the abundance of *nifH* gene and diversity of nitrogen-fixing microorganisms in soil of four types of scrubland. The abundance of *nifH* in rhizospheric soil of *Caragana*

收稿日期: 2024-06-19 修回日期: 2024-08-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(32160023、31760027), 宁夏自然科学基金项目(2023AAC03062)。

第一作者: 代金霞, 博士, 教授。主要研究方向: 微生物资源开发与利用。Email: daijx05@163.com 地址: 750021 银川市西夏区贺兰山西路 489 号宁夏大学生命科学学院。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

*korshinskii* was significantly higher than that in soil of *Ammopiptanthus mongolicus*, *Oxytropis aciphylla* and *Caragana tibetica* forestland ( $P < 0.05$ ). The richness of nitrogen-fixing microbial communities in soil of *C. korshinskii* and *A. mongolicus* forestland were significantly higher than that in *O. aciphylla* and *C. tibetica* soil ( $P < 0.05$ ). The community diversity was significantly higher in *C. korshinskii* soil than that of *A. mongolicus* soil ( $P < 0.05$ ). However, there were no significant differences in diversity of nitrogen-fixing microbial communities in soil of *O. aciphylla*, *C. tibetica* and *A. mongolicus* forestland. (2) A total of 5 phyla, 15 families and 19 genera of nitrogen-fixing microorganisms were detected in soil of legume scrubland. Proteobacteria was predominant phylum with relative abundance ranging from 91.13% to 97.79%. Rhodospirillaceae was common predominant family in rhizospheric soil of the four shrubs, relative abundance accounting for 59.56%–79.68%. At genus level, *Skermanella*, *Azospirillum* and *Azohydromonas* were common dominant genera. The composition of nitrogen-fixing microorganisms in soil of *A. mongolicus* differed significantly from the other three types of soil, with a large number of distribution of genus *Azotobacter* (accounting for 25.09%). (3) Correlation analysis showed that the abundance of *nifH* gene, richness index, and  $\beta$  diversity of nitrogen-fixing microorganisms were significantly positively correlated with soil pH. Soil available phosphorus, available potassium, pH, total nitrogen, and total phosphorus significantly affected the composition of nitrogen-fixing microbial communities. [Conclusion] The abundance of *nifH* gene, richness and diversity of nitrogen-fixing microorganisms in rhizospheric soil of *C. korshinskii* are higher than those in other scrubland soils. Soil microbial functional communities of *C. korshinskii* display stronger nitrogen accumulation and transformation abilities.

**Key words:** rhizosphere soil; *nifH* gene; nitrogen-fixing microorganisms; community composition

荒漠化是中国北方最严重的环境问题之一。在荒漠生态系统中,土壤养分匮乏,高等植物和动物的分布受到干旱极端环境条件的限制,生态系统稳定性较差。土壤微生物被认为是荒漠生态系统服务的主要驱动力,在促进土壤形成和发育、保护植物免受干旱和维持生态系统稳定性方面发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。微生物在土壤中的分布是植物、土壤和气候在内的环境因素综合作用的结果,是生态环境变化的敏感指标<sup>[2]</sup>。研究表明,在干旱条件下,植物根际能有效地富集具有促进多种植物生长活性的细菌群落,从而增强植物抗胁迫的能力,提高植物对极端环境的适应性<sup>[3]</sup>。荒漠植物和土壤微生物多样性的相互作用是荒漠生态系统多功能性的强大驱动力<sup>[4]</sup>。荒漠土壤微生物为适应恶劣的荒漠生态环境,表现出独特的生物代谢机制和抗性,而荒漠植被的适应性在很大程度上又依赖于土壤微生物的响应<sup>[5]</sup>。尤其是固氮相关微生物,在荒漠植物的发育和生长中起着不可或缺的作用<sup>[6]</sup>。固氮微生物群落介导的生物固氮是自然生态系统中氮输入的主要途径,能够将大气中的氮( $N_2$ )转化为容易被植物根系吸收的铵态氮,这对于促进植物生长发育、减少氮肥的施用和提高土壤肥力至关重要<sup>[7]</sup>。土壤中固氮微生物的数量和群落结构直接影响土壤固氮速率和氮循环,可作为衡量土壤质量的重要参考指标<sup>[8]</sup>。固氮微生物能够表达由 *nifHDK* 基因编码的固氮酶,其中编码固氮酶铁蛋白的 *nifH* 基因普遍存在于固氮菌中,因其

序列高度保守,系统发育分析与 16S rRNA 相似,因此被作为固氮菌的遗传标记物广泛应用于不同生境的固氮微生物丰度特征和群落结构的研究<sup>[9]</sup>。如史策等<sup>[10]</sup>以 *nifH* 基因为靶标,对北京海坨山典型林分土壤固氮菌群落特征进行了分析。魏庐璐等<sup>[11]</sup>通过 *nifH* 基因的高通量测序,对锦鸡儿属(*Caragana*)不同物种、不同种源间植物根际土壤固氮菌群落多样性及其与种源地气候和同质园土壤属性的关系进行了分析。

研究表明,荒漠土壤中固氮微生物的数量明显较高,并且土壤 pH 会通过影响微生物硝化和反硝化过程而改变固氮微生物的数量<sup>[12]</sup>。而固氮微生物的群落组成、分布特征和多样性也会随着土壤类型和植被种类的不同而表现出差异<sup>[13]</sup>。Sepp 等<sup>[14]</sup>认为,在热带及温带草原和半沙漠中,固氮植物的相对丰富度最高,而固氮细菌也有相同的模式。祁连山干旱草地土壤固氮菌群中蓝细菌(Cyanobacteria)占比高达 41%,为优势固氮类群<sup>[15]</sup>。内蒙古 3 种类型草原土壤中,固氮微生物以固氮螺菌属(*Azospirillum*)为绝对优势属<sup>[16]</sup>。而塔克拉玛干沙漠土壤中固氮螺菌属、根瘤菌属(*Rhizobium*)和慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)是优势固氮菌<sup>[17]</sup>。以上研究说明,不同微生物类群对环境变化的响应和适应存在差异,这种环境条件的异质性导致不同生境下固氮微生物的群落组成、多样性和丰度也明显不同。目前针对荒漠豆科灌丛林土壤固氮微生物的研究相对较

少,从群落水平揭示荒漠豆科灌丛根际土壤固氮微生物多样性、结构组成及其与环境因子之间的相互作用,对理解荒漠生态系统功能具有重要意义。

宁夏白芨滩国家级自然保护区位于毛乌素沙漠南缘,属于典型的荒漠类型自然保护区,保护区内分布有我国目前面积最大的天然柠条(*Caragana korshinskii*)群落和西北最大的猫头刺(*Oxytropis aciphylla*)群落,以及大面积的沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)和藏锦鸡儿(*Caragana tibetica*, 俗称毛刺)群落。这些荒漠豆科灌木经过长期自然选择和进化,成为恶劣环境中的先锋植物,它们通过自身的生理代谢和与土壤微生物间高度的相互作用,以实现适当的生存策略<sup>[18]</sup>。Tian 等<sup>[19]</sup>的研究表明,固氮微生物和植物之间的根际结合是生物体在生物圈中扩散、占据新生态位和适应各种环境压力的主要驱动力。为了解宁夏荒漠中典型的豆科灌木林地土壤固氮微生物群落组成和多样性特征,提高对植物-土壤-微生物之间相互作用的认识,本研究采用 *nifH* 基因荧光定量 PCR 技术和 Illumina MiSeq 高通量测序方法,对白芨滩荒漠自然保护区内的柠条、猫头刺、沙冬青和藏锦鸡儿 4 种典型的豆科灌丛根际土壤固氮微生物的丰度、多样性及群落结构组成进行分析,并将固氮微生物群落与土壤环境因子进行关联分析。研究结果旨在为探究干旱荒漠特定生境中植物根际固氮微生物群落的环境响应特征提供理论依据,也为未来荒漠化治理提供理论参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 土壤样品采集

于 2023 年 4—5 月灌木盛花期,在保护区内分别选定 3 块柠条、猫头刺、沙冬青和毛刺灌木林地,各林地间隔在 1 km 以上,每个林地内设置 500 m × 500 m 的样方,在每个样方内选取长势一致的 5 株植株,去除上层凋落物,用铁铲围绕根部挖去根周围的土壤,待根部暴露后,收集距表层 10~20 cm 处根部附着的土壤。将 5 株植株根际土壤混匀后分成 2 份,一份分装于灭菌的离心管并保存于液氮中用于 DNA 提取;另一份分装于密封袋中用冰盒保存带回实验室,过筛烘干后参考《土壤农业化学分析方法》测定土壤理化性质<sup>[20]</sup>。采用 pH 计测定土壤 pH;采用重铬酸钾容量法测定土壤有机质含量;采用半微量凯氏定氮法、NaOH 熔融-钼锑抗比色法和 NaOH 熔融-火焰光度法分别测定土壤全氮、全磷和全钾含量;采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法和醋酸铵-火焰光度法分别测定土壤速效磷和速效钾含量;采用酚二磺酸比色法、氯化钾浸提-靛酚蓝比色法和  $\alpha$ -萘

胺分光光度法分别测定土壤硝态氮、铵态氮和亚硝酸盐氮的含量。

### 1.2 土壤 DNA 的提取和 *nifH* 基因扩增

分别称取根际土壤样品 0.5 g,按照试剂盒(OMEGA, 美国)的操作说明提取土壤总 DNA,经琼脂糖凝胶和核酸测定仪检测 DNA 的完整性和浓度。以检测合格的土壤 DNA 为模板,采用引物对 *nifH*-ForF(5'-ACCCGCCTGATCCTGCACGCCAAGG')和 *nifH*-Rev(5'-ACGATGTAGATTCCTGGGCCTTGT-3')对固氮微生物标记基因 *nifH* 进行 PCR 扩增。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得约 300 bp 左右的单一条带即为目的基因片段。

### 1.3 *nifH* 基因实时荧光定量 PCR

*nifH* 基因 PCR 产物经回收纯化后连接到 pMD18-T 载体,筛选阳性克隆并提取质粒,随后进行梯度稀释,选取标准品的  $10^{-1} \sim 10^{-8}$  的稀释液用于制备标准曲线。采用 ABI7300 实时定量 PCR 系统,通过 SYBR Green I 染料法测定固氮菌 *nifH* 基因的拷贝数。根据刘爽等<sup>[21]</sup>的方法设置 PCR 反应体系和反应条件,每个样品设 3 次重复,以不加模板的 PCR 管为阴性对照。以荧光强度达阈值时的循环数(Ct 值)与浓度梯度构建标准曲线。将得到的样品 Ct 值代入标准曲线中,计算样品中 *nifH* 基因的拷贝数。

### 1.4 高通量测序和数据分析

将 *nifH* 基因 PCR 产物委托上海美吉生物医药科技技术有限公司进行 Illumina 高通量测序。序列数据通过拼接和质控后,有效序列按 97% 的相似性进行操作分类单元(operation classification unit, OTU)聚类,基于 NCBI 的 NT 数据库(<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/>)对 OTU 代表序列进行注释和分类,在各个分类水平上对样本的群落组成进行统计分析。利用美吉云平台进行 alpha 多样性指数分析,基于 Bray-Curtis 距离算法进行非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS),以评估不同土壤中固氮微生物群落的组成差异;应用 Gephi 软件(<https://gephi.org/>)创建共现网络图,通过 Fruchterman-Reingold 布局进行可视化。采用 SPSS 23.0 软件对土壤理化性质和固氮微生物群落进行 Spearman 相关性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 固氮微生物 *nifH* 基因丰度和多样性分析

由表 1 可知,4 种灌木林地土壤理化性质较为相似,柠条根际土壤中铵态氮含量显著高于沙冬青和猫头刺土壤,硝态氮含量显著高于毛刺和猫头刺土壤,其余养分含量、有机质和 pH 在 4 种土壤中没有

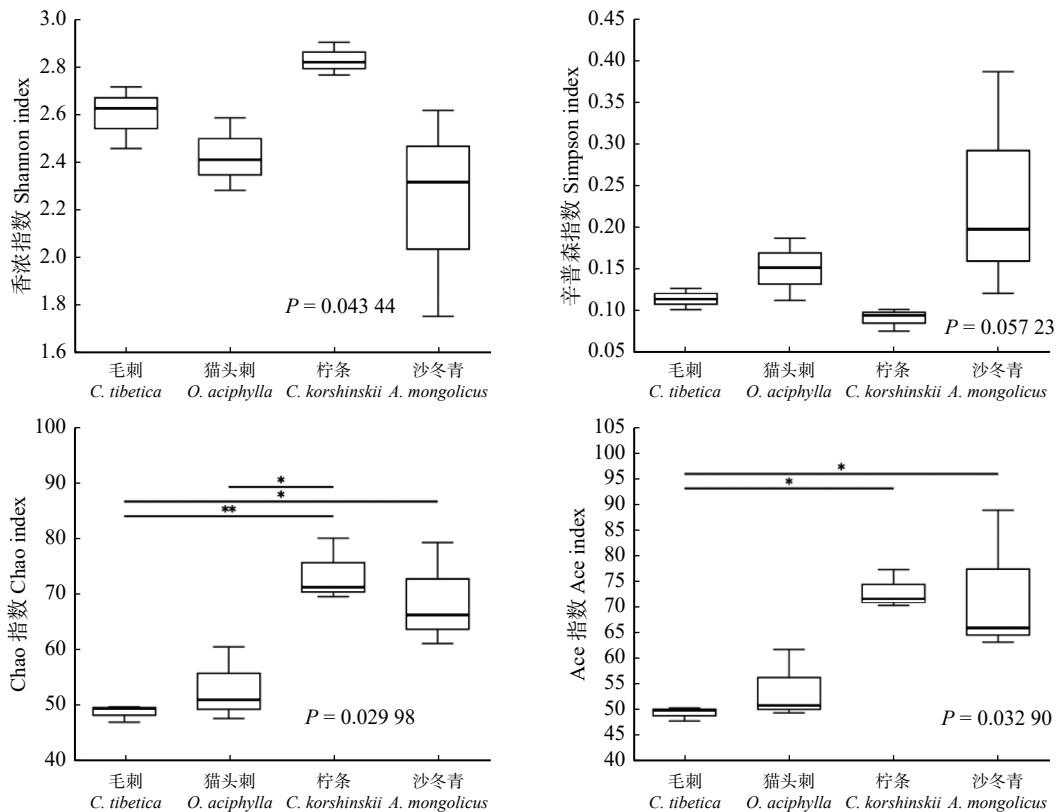
表1 不同灌丛土壤理化性质和 *nifH* 基因丰度Tab. 1 Soil physicochemical properties and *nifH* gene abundance of different shrubs

| 土壤理化性质<br>Physicochemical properties of soil                                       | 柠条<br><i>Caragana korshinskii</i> | 沙冬青<br><i>Ammopiptanthus mongolicus</i> | 毛刺<br><i>Caragana tibetica</i> | 猫头刺<br><i>Oxytropis aciphylla</i> |
|--|-----------------------------------|---|--------------------------------|-----------------------------------|
| pH   | 8.09 ± 0.35a                      | 8.01 ± 0.33a                            | 7.907 ± 0.15a                  | 7.92 ± 0.22a                      |
| 有机质 Organic matter (SOM)/(g·kg <sup>-1</sup> )                                     | 5.71 ± 1.24a                      | 4.71 ± 1.49a                            | 5.58 ± 1.31a                   | 4.12 ± 0.89a                      |
| 全氮 Total nitrogen (TN)/(g·kg <sup>-1</sup> )                                       | 0.52 ± 0.08a                      | 0.44 ± 0.06a                            | 0.43 ± 0.06a                   | 0.32 ± 0.01a                      |
| 全磷 Total phosphorous (TP)/(g·kg <sup>-1</sup> )                                    | 0.35 ± 0.03a                      | 0.32 ± 0.01a                            | 0.33 ± 0.02a                   | 0.29 ± 0.02a                      |
| 全钾 Total potassium (TK)/(g·kg <sup>-1</sup> )                                      | 17.10 ± 0.19a                     | 16.74 ± 0.23a                           | 16.80 ± 0.30a                  | 16.57 ± 0.09a                     |
| 硝态氮 Nitrate nitrogen (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N)/(mg·kg <sup>-1</sup> )      | 40.15 ± 11.10a                    | 22.23 ± 5.29ab                          | 16.81 ± 5.19b                  | 7.25 ± 0.99c                      |
| 铵态氮 Ammonium nitrogen (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N)/(mg·kg <sup>-1</sup> )     | 4.50 ± 0.29a                      | 4.06 ± 0.34b                            | 4.19 ± 0.31ab                  | 3.05 ± 0.40b                      |
| 亚硝酸盐氮 Nitrite nitrogen (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N)/(mg·kg <sup>-1</sup> )    | 39.68 ± 2.87a                     | 16.49 ± 1.76b                           | 20.22 ± 1.84b                  | 11.33 ± 1.43c                     |
| 速效磷 Available phosphorous (AP)/(mg·kg <sup>-1</sup> )                              | 5.46 ± 1.86a                      | 3.20 ± 0.87a                            | 3.72 ± 0.73a                   | 2.57 ± 0.14a                      |
| 速效钾 Available potassium (AK)/(mg·kg <sup>-1</sup> )                                | 133.25 ± 18.14a                   | 115.84 ± 17.47a                         | 113.24 ± 8.74a                 | 108.45 ± 8.12a                    |
| <i>nifH</i> 丰度 Abundance of <i>nifH</i> /(10 <sup>7</sup> copies·g <sup>-1</sup> ) | 2.43 ± 0.24a                      | 1.39 ± 0.53b                            | 0.70 ± 0.07b                   | 0.70 ± 0.04b                      |

注: 不同字母表示处理之间在0.05水平上差异显著。Note: different letters indicate significant differences at the level of 0.05.

显著差异。*nifH* 基因的定量分析结果表明, 4种灌丛根际土壤中 *nifH* 基因的拷贝数在  $0.70 \times 10^7 \sim 2.43 \times 10^7$  copies/g(以干土计)之间, 其中柠条根际土壤中 *nifH* 基因丰度显著高于沙冬青、猫头刺和毛刺土壤, 分别高出 74.8%、247.1% 和 247.1%, 后三者之间没有显著差异。

$\alpha$  多样性分析显示, 不同灌丛根际土壤中固氮微生物群落丰富度和多样性存在差异(图1)。表征群落丰富度的 Chao 和 Ace 指数在4种灌丛土壤中表现为柠条 > 沙冬青 > 猫头刺 > 毛刺, 其中柠条和沙冬青土壤固氮微生物群落丰富度指数显著高于毛刺和猫头刺土壤( $P < 0.05$ ), 猫头刺和毛刺土壤间无



\*和\*\*分别表示不同灌丛根际土壤固氮微生物群落丰富度指数差异显著( $P < 0.05$ )和极显著( $P < 0.01$ )。\* and \*\* indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) and extremely significant differences ( $P < 0.01$ ) of the richness index of nitrogen fixing microbial communities in rhizosphere soils of different shrubs.

图1 豆科灌丛根际固氮微生物 Alpha 多样性指数

Fig. 1 Alpha diversity index of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere soil of leguminous shrubs

显著差异。表征群落多样性的香浓指数在不同土壤中表现为柠条 > 毛刺 > 猫头刺 > 沙冬青, 辛普森指数则相反, 表现为沙冬青 > 猫头刺 > 毛刺 > 柠条, 4 种灌丛土壤中固氮微生物群落多样性指数差异不显著。

基于 OTU 水平对土壤样本进行非度量多维尺度分析, 不同灌丛土壤中固氮微生物群落具有明显

的分异 ( $stress < 0.1, P < 0.05$ , 图 2)。猫头刺根际固氮微生物群落与其他土壤样品差异较大, 而沙冬青和柠条土壤样本点呈交叉分布。组间相似性分析表明, 4 种灌丛根际土壤固氮微生物群落构成存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 但各样本间两两差异不显著, 分组因素对样本差异具有较好的解释度 ( $R^2 = 0.438, P = 0.006$ )。

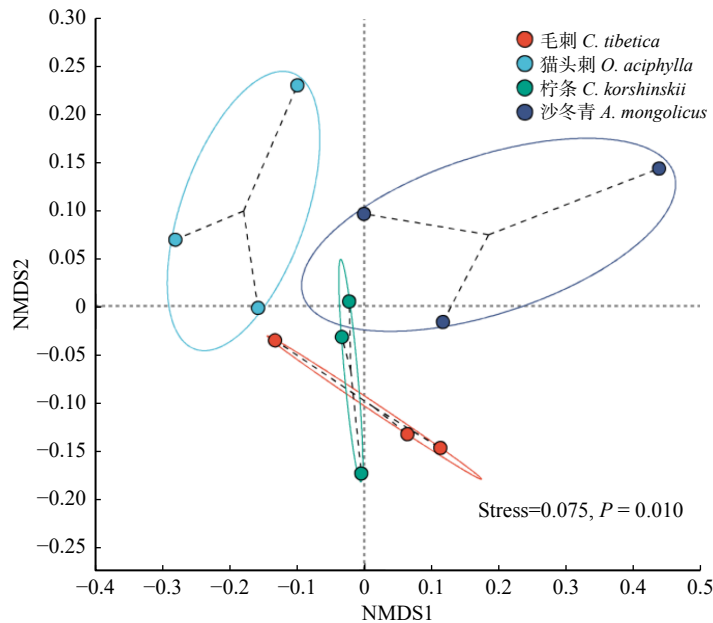


图 2 灌丛根际土壤固氮菌非度量多维尺度分析

Fig. 2 Nonmetric multidimensional scale analysis of nitrogen-fixing microbial communities in rhizosphere soil of shrubs

### 2.2 豆科灌木林地土壤固氮微生物群落组成分析

4 种灌丛根际土壤 *nifH* 基因高通量测序后共获得 198 845 条有效序列, 各样品的测序深度均在 99% 以上, 说明测序结果具有代表性。将序列相似性大于 97% 的有效序列进行聚类, 利用 Venn 图统计样本中共有和独有的 OTU 数目。结果显示共获得 152 个 OTU, 其中 40 个 OTU 为 4 种根际土壤共有, 柠条和沙冬青土壤中分别特有 23 个 OTU, 猫头刺和毛刺分别有 20 和 6 个特有 OTU (图 3)。所有固氮微生物分布于 5 门 15 科 19 属。在门水平上, 变形菌门在所有土壤中均占绝对优势 (图 4a), 相对丰度在 91.13% ~ 97.79% 之间, 其余多为未分类类群, 仅在柠条根际土壤中检测到极低丰度的厚壁菌门。在科水平上, 4 种灌丛根际土壤中共有固氮微生物 8 科, 其中红螺菌科为共有优势科, 占 59.56% ~ 79.68%。其次为产碱菌科, 其相对丰度在 4 种根际样品中存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。假单胞菌科是沙冬青根际的次优势科, 相对丰度为 25.09%, 极显著高于柠条 (0.34%) 和毛刺 (0.11%) 土壤 ( $P < 0.01$ ), 而猫头刺根际未检测到该类群。慢生根瘤菌科是柠条根际土壤特有科, 但丰度极低 (图 4b)。属水平上, 4 种

灌丛根际共有固氮微生物 10 个属, 斯科曼氏菌属是共有优势属, 相对丰度在 30.86% ~ 53.63% 之间, 在不同灌丛根际占比依次为猫头刺 > 柠条 > 毛刺 > 沙冬青, 沙冬青土壤中其相对丰度显著低于其他 3 种土壤 ( $P < 0.05$ )。固氮螺菌属 (11.51% ~ 35.11%) 是共有次优势菌属, 其次是固氮氢自养单胞菌属 (6.70% ~ 18.16%), 猫头刺土壤中固氮螺菌属、沙冬青土壤中固氮氢自养单胞菌属的相对丰度分别显著低于其他灌丛土壤。此外, 沙冬青土壤中固氮微生物组成与

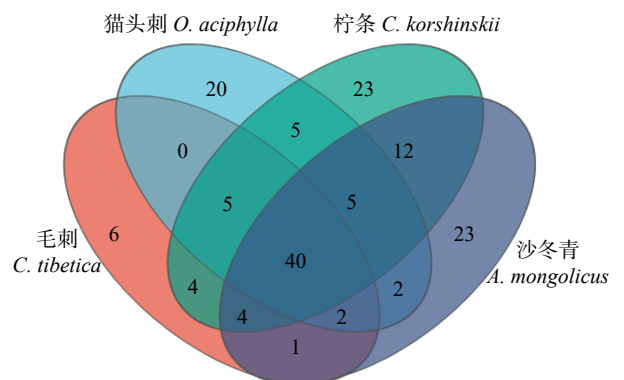
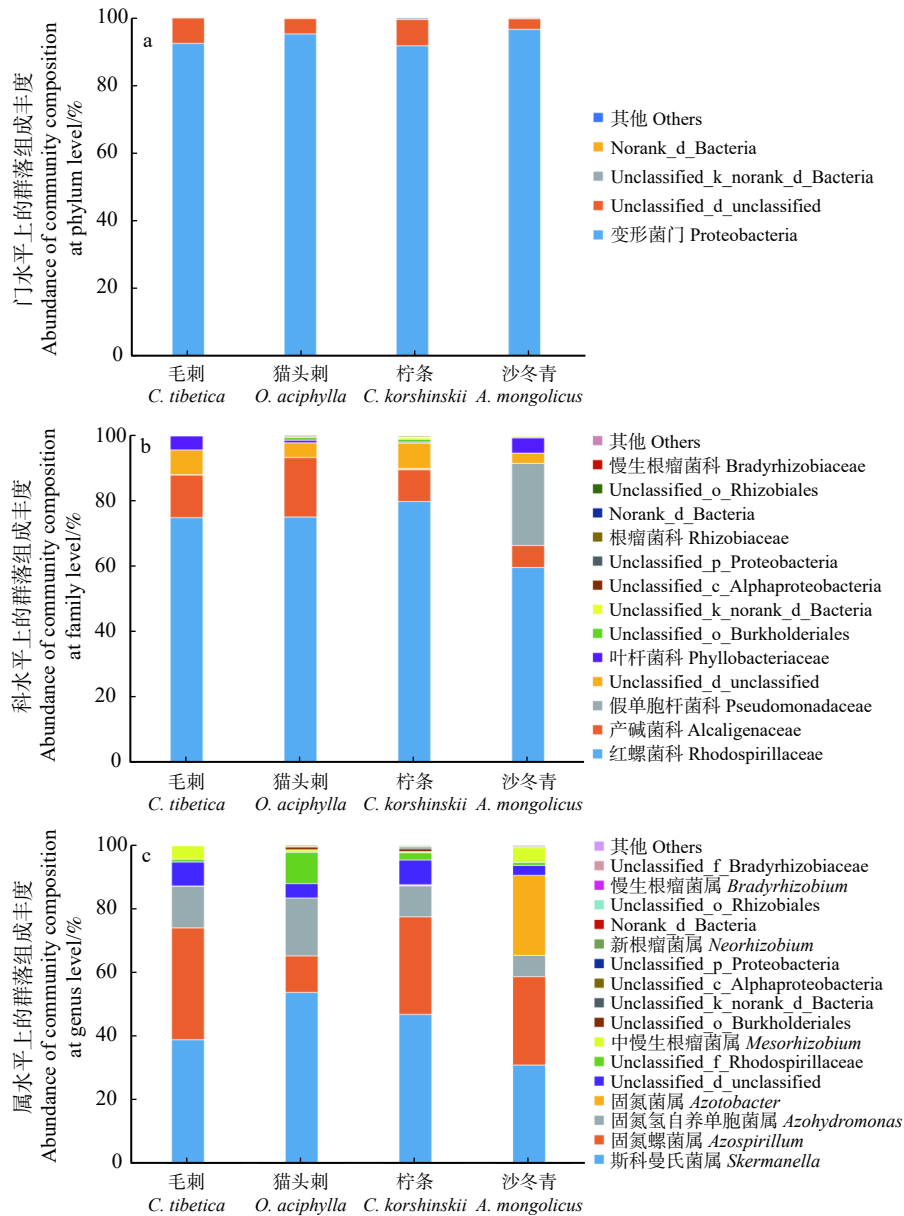


图 3 固氮微生物 OTU 水平 Venn 图

Fig. 3 Venn diagram of nitrogen-fixing microorganisms at OTU level



k\_界 Kingdom; d\_域 Domain; p\_门 Phylum; c\_纲 Class; o\_目 Order; f\_科 Family。下同。Same as below.

图4 豆科灌丛根际土壤固氮微生物的群落组成

Fig. 4 Community composition of nitrogen-fixing microorganisms in rhizosphere soil of leguminous shrubs

其他3种土壤差别较大,有25.09%的固氮菌属分布,而该属在柠条根际仅占0.33%,毛刺和猫头刺土壤中则未检测到(图4c)。

## 2.3 固氮微生物与土壤理化因子的相关性分析

### 2.3.1 *nifH* 基因丰度和固氮微生物多样性与土壤理化的相关性

将4种灌丛根际固氮微生物 *nifH* 基因丰度和多样性与土壤理化性质进行 Pearson 相关性分析。结果表明(表2), *nifH* 基因丰度与速效钾显著正相关,与 pH 呈极显著正相关关系;香浓指数与土壤有机质显著正相关, Ace 和 Chao 指数与 pH 极显著正相关;  $\beta$  多样性与全氮和 pH 显著正相关。其他土壤因子与固氮微生物多样性之间相关性不显著。

### 2.3.2 固氮菌群落组成与土壤理化的相关性

固氮微生物群落组成与土壤理化性质的相关性分析显示(图5),土壤硝态氮、速效磷、pH、速效钾、全氮和全磷显著影响固氮微生物群落组成。一些未分类的固氮微生物与多个土壤因子显著正相关,如 unclassified\_f\_Bradyrhizobiaceae 和 unclassified\_o\_Rhizobiales 与速效磷、全钾、全氮和全磷显著正相关;根瘤菌属与硝态氮、pH、速效钾、有机质和全氮显著正相关;慢生根瘤菌属与硝态氮和速效磷显著正相关;而中慢生根瘤菌属与硝态氮和速效磷显著负相关;固氮螺菌属与硝态氮显著负相关。而4种灌丛根际共有优势属斯科曼氏菌属和固氮氢自养单胞菌属与理化因子没有显著相关性。

表 2 *nifH* 丰度及多样性指数与土壤理化性质的 Pearson 相关性分析

| 指数<br>Index                          | 全氮<br>TN | 全磷<br>TP | 全钾<br>TK | 硝态氮<br>NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | 铵态氮<br>NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | 亚硝酸盐氮<br>NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | 速效磷<br>AP | 速效钾<br>AK | 有机质<br>SOM | pH      |
|--------------------------------------|----------|----------|----------|--|--|--|-----------|-----------|------------|---------|
| <i>nifH</i> 丰度 <i>nifH</i> abundance | 0.565    | 0.447    | 0.567    | 0.507                                  | 0.343                                  | 0.144                                    | 0.521     | 0.658*    | 0.381      | 0.821** |
| 香浓指数 Shannon index                   | 0.552    | 0.538    | 0.395    | -0.177                                 | -0.058                                 | 0.087                                    | 0.283     | 0.531     | 0.689*     | -0.021  |
| Ace 指数 Ace index                     | 0.235    | 0.132    | 0.304    | 0.140                                  | 0.222                                  | 0.083                                    | 0.228     | 0.417     | 0.164      | 0.756** |
| Chao 指数 Chao index                   | 0.357    | 0.252    | 0.361    | 0.242                                  | 0.260                                  | 0.066                                    | 0.315     | 0.519     | 0.277      | 0.796** |
| β 多样性 β diversity                    | 0.579*   | 0.286    | 0.526    | 0.287                                  | 0.126                                  | 0.413                                    | 0.399     | 0.424     | 0.51       | 0.669*  |

注: \*和\*\*表示 *nifH* 丰度及多样性指数与土壤理化性质显著相关 ( $P < 0.05$ ) 和极显著相关 ( $P < 0.01$ ); Notes: \* and \*\* indicate abundance and diversity index of *nifH* are significantly correlated ( $P < 0.05$ ) and extremely significantly correlated ( $P < 0.01$ ) with soil physicochemical properties.

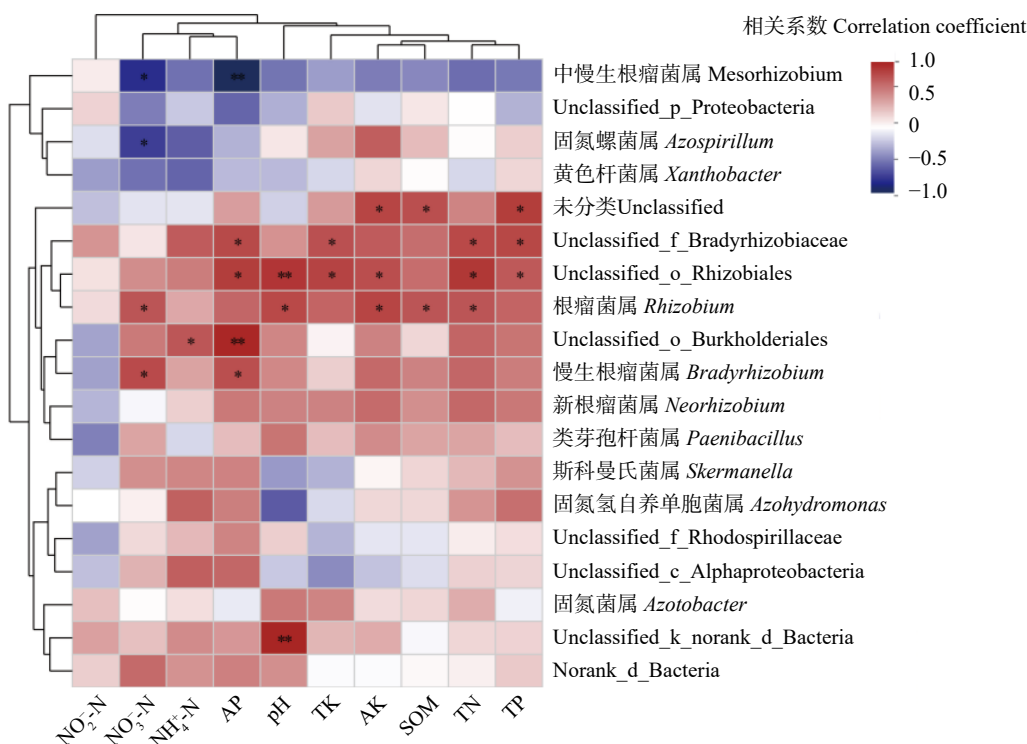


图 5 固氮微生物群落与环境因子关联分析

Fig. 5 Correlation analysis between nitrogen-fixing bacteria and environmental factors

#### 2.4 根际固氮微生物共现网络分析

基于 OTU 水平构建了 4 种灌丛根际土壤固氮菌群落的共现网络。该网络共包含 152 个节点和 872 条边。其中正相关边数 830 条 (占 95.18%), 负相关边数仅为 42 条 (占 4.82%)。固氮微生物网络节点整体上的聚类程度较好, OTU 之间具有高度连接性, 表明固氮微生物群落之间形成了较稳定的协同关系。在门水平将网络中的节点进行划分 (图 6a), 占比最高的节点为变形菌门, 占有所有节点的 64.05%, 其次多是未被注释的类群, 因此灌丛根际土壤中生长和代谢功能活跃的变形菌门在网络结构中发挥着关键作用。将网络中的节点按属水平进行划分 (图 6b), 占比最高的节点为未分类类群, 占有所有节点的 59.48%, 其次是斯科曼氏菌属 (11.11%) 和固氮螺菌属 (10.46%), 其他类群占比较少, 这说明根际土

壤中丰度较高的菌属以及一部分无法被明确分类的菌属在固氮功能的维持上可能共同发挥着重要作用。

### 3 讨 论

生物固氮是荒漠生态系统中氮素补充的重要途径。*nifH* 基因作为研究固氮细菌生态和进化的重要标志物, 被广泛应用于各种环境的固氮微生物多样性研究中。对土壤 *nifH* 基因拷贝数进行定量分析, 可反映出土壤中固氮微生物的数量。张萌<sup>[16]</sup>对内蒙古草甸草原、典型草原和荒漠草原土壤固氮菌 *nifH* 基因的定量分析表明, 3 种类型草原的 *nifH* 基因丰度存在明显差异, 其拷贝数的数量级在  $10^5$  ( $1.38 \times 10^5 \sim 6.84 \times 10^5$  copies/g 干土); Liu 等<sup>[22]</sup>的研究表明, 北方草原土壤中 *nifH* 基因丰度为  $10^7 \sim 10^8$  copies/g 干土, 且固氮基因丰度随着土壤深度的增加而减

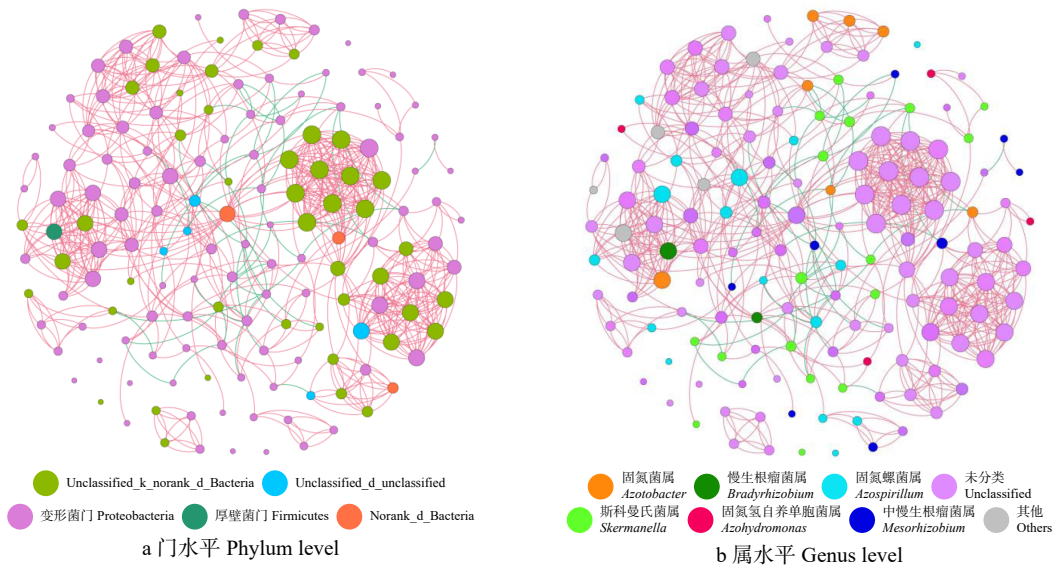


图6 固氮微生物共现网络分析

Fig. 6 Co-occurrence network analysis of nitrogen-fixing microorganisms

少。本研究结果则显示,宁夏荒漠灌丛根际土壤中 *nifH* 基因拷贝数介于  $10^6 \sim 10^7$  copies/g 干土之间,反映出该区灌丛土壤中具有较高丰度的固氮微生物,且其丰度因灌丛种类不同而表现出显著差异。大量研究证实,微生物功能基因的丰度与植物种类、区域尺度和环境因子等密切相关。如 Zou 等<sup>[23]</sup>的研究表明,东北黑土中 *nifH* 基因丰度不仅受种植制度和作物类型的影响,还与土壤速效磷含量密切相关;何冬华等<sup>[24]</sup>的研究发现, *nifH* 基因的相对丰度与土壤速效钾含量极显著正相关。Chen 等<sup>[25]</sup>的研究显示 *nifH* 基因丰度与土壤有机质、速效钾、速效磷和速效氮含量呈正相关。而 Ding 等<sup>[26]</sup>则认为 pH 值是影响内蒙古草原土壤中 *nifH* 基因丰度的主要因子。在本研究中,4 种灌丛根际土壤 *nifH* 基因的丰度仅与速效钾和 pH 显著正相关,而土壤氮素、磷素和有机质含量等对 *nifH* 基因没有显著影响,这与 Chen 等<sup>[27]</sup>的研究结果类似。此外, *nifH* 基因丰度和 Alpha 多样性受植物类型影响较大,柠条灌丛根际土壤中固氮微生物群落的多样性和丰富度最高。这些结果说明固氮微生物的丰度变化受到不同生境中非生物和生物因素的共同影响,而特定的固氮类群也可以对相同的变量表现出不同的响应。

大量研究表明,固氮微生物群落对土壤因素的变化高度敏感,如 pH、有机质和有效养分含量。Fierer 等<sup>[28]</sup>发现土壤 pH 是驱动固氮微生物多样性和群落组成的关键因子。而 Zou 等<sup>[23]</sup>的研究则显示,固氮微生物群落从丰度、多样性和群落结构方面的变化对速效磷含量高度敏感,速效磷是固氮微生物种群变化的主要驱动因素。本研究中 4 种灌丛根际 *nifH* 丰度、固氮微生物丰富度和群落组成均受 pH 的显

著影响,一些未分类固氮类群还与土壤全氮、全磷、速效钾和速效磷含量等显著相关。土壤 pH 作为土壤质量的一个重要组成部分,与一些土壤特性密切相关, pH 可能通过影响这些土壤特性共同驱动微生物群落的变化。Chen 等<sup>[27]</sup>的研究发现,土壤无机氮含量与 *nifH* 群落组成相关,但与 *nifH* 丰度无关,在影响土壤氮有效性方面,固氮微生物群落的组成可能比丰度更重要。本研究中 *nifH* 丰度和多样性指数与土壤氮素含量并不相关,而一些共生固氮类群如根瘤菌属、慢生根瘤菌属和中慢生根瘤菌属等则受土壤氮素显著影响,这与 Chen 等<sup>[27]</sup>的研究结果相似,也与刘璐等<sup>[13]</sup>对喀斯特土壤固氮微生物群落影响因素的研究结果一致。此外,灌丛根际丰度最高的共有类群斯科曼氏菌属与所有土壤理化因子没有显著相关性,这与我们先前对 5 个柠条林地固氮微生物群落的研究结果相同<sup>[29]</sup>。许多通过 *nifH* 高通量测序的结果都表明斯科曼氏菌属是土壤优势类群,但该属虽含有 *nifH* 基因却不能固氮,该类群具体生态功能还有待进一步研究。

不同植物根系分泌物的数量和质量会诱导不同的微生物在根际定殖,从而改变土壤中固氮微生物的种类、数量和分布,而根际微生物群落结构的差异也会影响根际土壤理化特性和局部小气候,从而影响植物的生长发育<sup>[30]</sup>。4 种灌丛根际固氮微生物群落在门水平上组成相似,均以变形菌门为绝对优势类群。已有的研究显示,变形菌门是草地、荒漠、森林以及农田土壤优势固氮类群<sup>[31]</sup>。变形菌门细胞壁较厚,在受到干旱胁迫后会在根际明显富集,许多变形菌能够通过水平基因转移,赋予其他细菌光合自养的能力,突显了其在养分受限条件下的重要性<sup>[32]</sup>。

因此, 变形菌门也成为荒漠土壤中最主要的类群。红螺菌科和产碱菌科是 4 种荒漠豆科灌丛根际的共有优势科。红螺菌科适于沙漠和岩石生物膜等干旱环境, 可以在干燥条件下参与到生物土壤结皮的最初形成过程中, 也是内蒙古荒漠草原生物土壤结皮的核心微生物类群<sup>[33]</sup>。产碱菌科具有很强的碱性耐受能力, 能够在高碱性环境中生存和繁殖, 还能够降解有机污染物、重金属离子和农药残留等, 在生物工程和修复等领域具有重要的应用价值。斯科曼氏菌属、固氮螺菌属、固氮氢自养单胞菌属是 4 种灌丛根际共有优势属, 但其相对丰度在 4 种土壤中有明显差异。在广泛环境下进行的 *nifH* 多样性调查已经证明, 固氮微生物的多样性和群落组成在不同生境和地区存在显著差异。它们的多样性和结构因生物地理特征而异, 但无论空间异质性如何, 起特殊作用的这些微生物都是共存的<sup>[34]</sup>。植物往往选择特定的微生物组成和功能群落维持生态系统的稳定。本研究的共现网络分析也表明, 除了未分类类群, 斯科曼氏菌属和固氮螺菌属是豆科灌丛共现网络中的关键类群, 这些优势类群占据生态系统核心地位。网络中正相关边数占 95.18%, 表明种群之间多为合作关系, 群落结构相对稳定。因此, 在相同或相似生境条件下, 灌丛根际固氮微生物群落结构组成极为相似, 其丰度差异可能源于植物种类的制约和根际微环境的不同。

## 4 结 论

宁夏荒漠草原豆科灌丛根际土壤中分布着丰富的固氮微生物资源, 变形菌门是根际共有的优势固氮功能类群。土壤速效磷、速效钾、pH、全氮和全磷显著影响固氮微生物群落组成。4 种灌丛根际固氮微生物多样性和群落结构存在差异。柠条根际土壤中 *nifH* 基因丰度、固氮微生物丰富度和多样性均高于其他灌丛土壤, 表明其根际微生物功能群落具备更强的氮素积累和转化能力。该研究结果可为未来荒漠化治理提供理论参考。

### 参 考 文 献

- [1] Venturi V, Keel C. Signaling in the rhizosphere[J]. Trends Plant Science, 2016, 21(3): 187–198.
- [2] Barea J M. Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2015, 15: 261–282.
- [3] Soussi A, Ferjani R, Marasco R, et al. Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnological potential[J]. Plant Soil, 2016, 405(1-2): 357–370.
- [4] 雷雨昕. 河西走廊荒漠土壤微生物多样性分布格局 [D]. 兰州: 兰州理工大学, 2023.
- Lei Y X. Study on the distribution pattern of microbial diversity in desert soil in the Hexi Corridor[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2023.
- [5] Alfaro F D, Manzano M, Almiray C, et al. Soil bacterial community structure of fog-dependent *Tillandsia landbeckii* dunes in the Atacama Desert[J]. Plant Systematics and Evolution, 2021, 307(5): 1–11.
- [6] Delgado-Baquerizo M, Reich P B, Trivedi C, et al. Multiple elements of soil biodiversity drive ecosystem functions across biomes[J]. Nature Ecology & Evolution, 2020, 4(2): 210–220.
- [7] Aasfar A, Bargaz A, Yaakoubi K, et al. Nitrogen fixing azotobacter species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 628379.
- [8] 李建宏, 李雪萍, 卢虎, 等. 高寒地区不同退化草地植被特性和土壤固氮菌群特性及其相关性 [J]. 生态学报, 2017, 37(11): 3647–3654.
- Li J H, Li X P, Lu H, et al. Characteristics of, and the correlation between, vegetation and N-fixing soil bacteria in alpine grassland showing various degrees of degradation[J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(11): 3647–3654.
- [9] Kizilova A K, Titova L N, Kravchenko I K, et al. Evaluation of the diversity of nitrogen-fixing bacteria in soybean rhizosphere by *nifH* gene analysis[J]. Mikrobiologiya, 2012, 81(5): 672–681.
- [10] 史策, 聂立水, 魏一凡, 等. 北京海坨山典型林分土壤固氮菌群落特征研究 [J]. 林业科学研究, 2022, 35(4): 153–161.
- Shi C, Nie L S, Wei Y F, et al. Characteristics of soil nitrogen-fixing bacteria community of typical forest stands at Haituo Mountain, Beijing[J]. Forest Research, 2022, 35(4): 153–161.
- [11] 魏庐潞, 徐婷婷, 李媛媛, 等. 同质园环境和遗传分化影响锦鸡儿属植物根际土壤固氮菌多样性和群落结构 [J]. 生物多样性, 2023, 31(4): 1–12.
- Wei L L, Xu T T, Li Y Y, et al. The common garden environment and genetic differentiation jointly influence the diversity and community structure of nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere soil of three *Caragana* species[J]. Biodiversity Science, 2023, 31(4): 1–12.
- [12] Marasco R, Mosqueira M J, Fusi M, et al. Rhizosphere microbial community assembly of sympatric desert spear grasses is independent of the plant host[J/OL]. Microbiome, 2018, 6: 215 [2023–12–04]. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0597-y>.
- [13] 刘璐, 何寻阳, 杜虎, 等. 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 X Y, Du H, et al. The relationships among nitrogen-fixing microbial communities, plant communities, and soil properties in karst regions[J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(12): 4037–4044.
- [14] Sepp S K, Vasar M, Davison J. Global diversity and distribution of nitrogen-fixing bacteria in the soil[J/OL]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1100235[2023–11–20]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1100235>.

- [15] Li Y M, Wang S P, Jiang L L, et al. Changes of soil microbial community under different degraded gradients of alpine meadow[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2016, 222: 213–222.
- [16] 张萌. 内蒙古三种草原类型土壤中固氮菌群多样性分析及其分离鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2021.  
Zhang M. Composition, diversity and isolation of nitrogen fixation bacteria in three types of grasslands[D]. Huhhot: Inner Mongolia University, 2021.
- [17] 徐玲花. 塔克拉玛干沙漠微生物固氮酶基因多样性及其活性的研究[D]. 武汉: 中国地质大学, 2014.  
Xu L H. Study on nitrogenase gene diversity and activity of microorganism in the Taklamakan Desert[D]. Wuhan: China University of Geosciences, 2014.
- [18] Marasco R, Rolli E, Ettoumi B, et al. A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming[J/OL]. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e48479[2023–10–31]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048479>.
- [19] Tian Y, Ma X, Li Y, et al. Exploring the structural changes in nitrogen-fixing microorganisms of rhizosphere during the growth of *Stipagrostis pennata* in the desert[J/OL]. *Bioscience Reports*, 2021, 41 (4): BSR20201679[2024–04–14]. <https://doi.org/10.1042/BSR20201679>.
- [20] 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.  
Lu R K. Analysis methods of soil agro-chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000.
- [21] 刘爽, 姚佳妮, 张钧杰, 等. 荒漠豆科灌丛根际土壤氨氧化和反硝化微生物功能基因丰度及群落多样性特征[J]. *草业学报*, 2024, 33(5): 115–127.  
Liu S, Yao J N, Zhang J J, et al. Functional gene abundance and community diversity of ammonia-oxidizing and denitrifying microorganisms in the rhizosphere soil of desert leguminous shrubs[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(5): 115–127.
- [22] Liu Y, Chi Q, Cheng H, et al. Comparative microbial nitrogen functional gene abundances in the topsoil vs. subsoil of three grassland habitats in Northern China[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 12: 792002[2024–01–14]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.792002>.
- [23] Zou J, Yao Q, Liu J, et al. Changes of diazotrophic communities in response to cropping systems in a Mollisol of Northeast China[J/OL]. *PeerJ*, 2020, 8: e9550[2023–07–15]. <https://doi.org/10.7717/peerj.9550>.
- [24] 何冬华, 陈俊辉, 徐秋芳, 等. 集约经营对毛竹林土壤固氮细菌群落结构和丰度的影响[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(10): 2961–2968.  
He D H, Chen J H, Xu Q F, et al. Effects of intensive management on abundance and composition of soil N<sub>2</sub>-fixing bacteria in *Phyllostachys heterocyclus* stands[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(10): 2961–2968.
- [25] Chen S, Xiang X L, Ma H L, et al. Straw mulching and nitrogen fertilization affect diazotroph communities in wheat rhizosphere[J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 658668[2024–05–20]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.658668>.
- [26] Ding K, Zhong L, Xin X P, et al. Effect of grazing on the abundance of functional genes associated with N cycling in three types of grassland in Inner Mongolia[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2015, 15(3): 683–693.
- [27] Chen J, Shen W, Xu H, et al. The composition of nitrogen-fixing microorganisms correlates with soil nitrogen content during reforestation: a comparison between legume and non-legume plantations[J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 508[2024–03–14]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00508>.
- [28] Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(3): 626–631.
- [29] 刘爽, 姚佳妮, 沈聪, 等. 荒漠植物柠条根际土壤 nifH 基因荧光定量及固氮菌多样性分析[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(12): 252–262.  
Liu S, Yao J N, Shen C, et al. Quantitative real-time PCR of nifH gene and diversity analysis of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere soil of *Caragana* spp. in desert grassland[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(12): 252–262.
- [30] Inderjit. Soil microorganisms: an important determinant of allelopathic activity[J]. *Plant and Soil*, 2005, 274: 227–236.
- [31] Fernández-Méndez M, Turk-Kubo K A, Buttigieg P L, et al. Diazotroph diversity in the sea ice, melt ponds, and surface waters of the eurasian basin of the central arctic ocean[J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1884[2023–11–23]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01884>.
- [32] Baker K L, Langenheder S, Nicol G W, et al. Environmental and spatial characterisation of bacterial community composition in soil to inform sampling strategies[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 41(11): 2292–2298.
- [33] 唐凯. 生物土壤结皮中好氧不产氧光营养细菌群落结构及其功能研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.  
Tang K. The community structure and function of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in biological soil crusts[D]. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.
- [34] Bouffaud M L, Renoud S, Moëgne-Loccoz Y, et al. Is plant evolutionary history impacting recruitment of diazotrophs and nifH expression in the rhizosphere?[J/OL]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21690[2016–02–23]. <https://doi.org/10.1038/srep21690>.

(责任编辑 孟瑶  
责任编辑 杨晓晖)