



## 不同时期艾比湖湿地盐角草群落土壤固氮微生物的多样性分析

靳希桐, 胡文革\*, 贺帅兵, 周婷婷, 王月娥, 钟镇涛

石河子大学生命科学学院, 新疆 石河子 832000

**摘要:**【目的】研究新疆艾比湖湿地不同季节盐角草根际和非根际土壤固氮微生物的多样性和丰富度与环境因子的相关性,以期探究在荒漠化和盐渍化不断严重的艾比湖湿地中随着季节变化的固氮微生物群落对恢复生态功能起到的潜在作用,为后续的湿地保护和退化恢复工作提供理论支持和数据基础。【方法】应用 Illumina HiSeq PE250 测序技术,分析 6 个土壤样本固氮微生物的多样性,结合相关的理化因子并利用 RDA 分析法探究土壤理化性质和固氮微生物菌落结构及丰富度的相关性。【结果】艾比湖湿地盐角草植物根际土壤的固氮微生物多样性高于非根际土壤,7 月的土壤固氮微生物多样性高于 10 月和 4 月的土壤。土杆菌属(*Geobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、固氮菌属(*Azotobacter*)和慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)等为盐角草根际和非根际土壤中的共同优势菌属。这些固氮微生物优势菌属隶属于变形菌门(*Proteobacteria*)和蓝藻门(*Cyanobacteria*),且相对丰富度占比为 85%和 10%,其余各菌门共占比较少,仅为 5%。土壤中固氮微生物的优势菌群与碱解氮(AN)、全氮(TN)、速效钾(AK)和有效磷(TP)呈显著相关。【结论】随着时间的推移土壤样本中固氮微生物的多样性和群落结构也发了改变,同一时期植物根际与非根际土壤中固氮微生物的群落结构并不相同。土壤的环境因子与固氮细菌的群落结构和丰富度的相关性研究可以为艾比湖湿地的退化恢复提供数据基础和理论支持。

**关键词:** 艾比湖湿地, 固氮基因(*nifH*), 固氮微生物多样性, 环境因子

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,固氮微生物将大气中的氮气还原成被植物吸收利用的  $\text{NH}_4^+$  的过程称之为生物固氮<sup>[1]</sup>。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,产生的含氮化合物约占固氮总量的 70%,是最重要的固氮途径。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<sup>[1]</sup>。目前发现的固氮微生物都属于原核生物界,分 59 个属,这些固氮微生物体内存在一种具有催化功能的固氮酶<sup>[2]</sup>。固氮酶复合物是由 *nifD* 和 *nifK* 基因编码的钼铁蛋白和由 *nifH* 基因编码的铁蛋白构成的<sup>[3]</sup>。*nifH* 基因只存在于固氮微生物中,是进化过程中

基金项目: 国家自然科学基金(31160026, 31560040)

\*通信作者。E-mail: hwg-t@163.com

收稿日期: 2018-12-29; 修回日期: 2019-03-08; 网络出版日期: 2019-06-13

最古老的功能基因之一<sup>[4-5]</sup>, 其系统进化关系和 16S rRNA 相一致。所以, *nifH* 基因是研究固氮微生物群落结构的标记基因<sup>[6-7]</sup>, 常用来证明固氮菌的存在, 同时也用以揭示固氮微生物群落结构与环境的关系<sup>[8]</sup>。

新疆艾比湖湿地作为干旱区典型的高盐湖泊湿地, 属湖泊湿地、沼泽湿地及河流湿地的组合, 兼具这几种湿地类型的特性<sup>[9]</sup>, 对区域动植物栖息、生物多样性和区域生态平衡的维护有着重要意义<sup>[10]</sup>。艾比湖湿地的优势盐生种群藜科植物盐角草(*Salicornia europaea*), 具有很强的耐盐能力, 在盐渍生境中起着极其重要的建群作用<sup>[11]</sup>。目前, 关于艾比湖湿地固氮菌的相关研究报道很少, 仅见于杨迪等<sup>[12]</sup>用 MPN 计数法和 Pearson 相关性分析法对艾比湖湿地固氮菌多样性的研究, 而对于采用较为先进的高通量 Illumina Hiseq PE250 测序平台对不同季节植物根际与非根际土壤固氮微生物的多样性及丰富度的研究还没有报道。

本文选取新疆艾比湖湿地代表性建群植物盐角草不同季节根际和非根际土样, 以固氮微生物代表基因 *nifH* 基因为分子标记, 对不同季节固氮微生物的多样性进行研究。旨在研究新疆艾比湖湿地不同季节盐角草根际和非根际土壤固氮微生物的多样性和丰富度与环境因子的相关性, 以期探究在荒漠化和盐渍化不断严重的艾比湖湿地中随着季节变化的固氮微生物群落对恢复生态功能起到的潜在作用, 为后续的湿地保护和退化恢复工作提供理论支持和数据基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究区概况

艾比湖湿地位于新疆博尔塔拉蒙古自治州,

地处东经 82°36′–83°50′, 北纬 44°37′–45°15′, 总面积为 2670.85 km<sup>2</sup>, 是我国西部重要的湿地保护区。艾比湖湿地是我国不多见的荒漠风口湖泊湿地, 长年受阿拉山口大风的影响, 拥有特殊的地理位置和较脆弱的生态系统, 对入湖水的减少、植被的退化等变化非常敏感<sup>[13-14]</sup>。由于艾比湖湿地特殊的环境及地理位置, 形成了独特的湿地生态环境和丰富的生物多样性资源, 具有典型性和较高的保护价值。盐生植物盐角草为该地区的典型建群植物之一。

### 1.2 样品采集、处理与保存

本研究采用多点采样的方法, 分别于 2017 年 7 月、2017 年 10 月和 2018 年 4 月在艾比湖湿地国家级自然保护区选取盐角草植物群落区域(82°43′46.35″E–44°51′3.59″N, 海拔为 193.2 m)随机选取 5 个盐角草植物群落, 每个群落分别选 3 株植株的根际土和对应的非根际土壤作为生物学重复。根际土的采取是将植株根系全部拔起后, 用灭菌的刷子收集紧附在根系表面的根际土壤, 同时, 选取植株旁边的无根区域取表层 5–20 cm 的土壤作为相对的非根际土壤, 采样完成后将植被埋回原处。每个植物群落根际土壤为 1 组, 非根际土壤为另一组, 先将组内的土壤进行混匀, 过 2 mm 筛后将 5 组土样混匀作为 1 个样本, 装于无菌袋中并贴上标签(S 代表盐角草根际土壤、SN 代表盐角草非根际土壤)。运回实验室后分为 3 部分处理; (1) 装入铝盒, 用于土壤含水量(SM)的测定; (2) 自然风干, 研磨, 过筛, 用于土壤理化性质的测定; (3) –80 °C 冰箱保存, 用于土壤总 DNA 的提取。

### 1.3 土壤理化性质测定方法

取回的土样, 经风干、去杂、过 100 目筛后

用于测定土壤酸碱度(pH)、电导率(EC)、全氮(TN)、全钾(TK)、全磷(TP)、碱解氮(AN)、速效钾(AK)、速效磷(AP)、有机质(OM)的含量。全氮的测定采用凯氏定氮法,全钾的测定采用 NaOH 熔融-火焰光度法,全磷含量的测定采用 NaOH 熔融-钼锑抗比色法;碱解氮含量用碱解扩散法;速效磷含量测定采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法;速效钾含量测定用乙酸铵浸提-火焰光度法。有机质含量测定用重铬酸钾容量法-外加热法<sup>[15]</sup>。

#### 1.4 土壤 DNA 的提取和固氮菌 *nifH* 基因 PCR 扩增

采用 PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio 公司)试剂盒提取环境样品总 DNA。土壤基因组 DNA 送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行基于 Illumina HiSeq 测序平台的双末端测序。

固氮菌 *nifH* 基因的扩增引物序列如下: PolyF: 5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3', PolyR: 5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3'。该引物可以从土壤总 DNA 中扩增到大约 360 bp 的目的基因片段。PCR 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 60.7 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。

#### 1.5 数据分析

选择去除 barcode 和 primer 后得到的有效数据进行后续分析,利用 Uparse 软件对所有样品的全部有效序列(Effective tags)进行聚类,默认以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTUs,同时选取代表性序列,对 OTUs 代表序列进行物种注释,并构建稀释曲线。对不同样本在 97% 一致性阈值下的 Alpha Diversity 指数(Shanon、Simpson、Chao1、ACE、Goods-Coversge)进行统计,利用 Canoco 5.0 软件对物种及环境之间进行相关性分析(RDA)。利用 Excel 2010、SPSS 19.0 进行数据统计与分析。

测序的序列已经提交到 NCBI 并获得登录号, S7 的登录号为 SRR8208874, S10 的登录号 SRR8208873, S4 的登录号 SRR8208872, SN7 的登录号 SRR8208871, SN10 的登录号 SRR8208876, SN4 的登录号 SRR8208875。

## 2 结果和分析

### 2.1 艾比湖湿地盐角草根际与非根际土壤的理化性质

利用 SPSS19.0 对盐角草根际与非根际土壤的理化性质进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。由表 1 可知,盐角草根际与非根际土壤的理化性质存在如下特征:均为碱性土壤;有机质含量较高;含水量较低。土壤电导率(EC)含量在不同季节之间出现了显著性差异( $P < 0.05$ ),7 月土壤 > 10 月土壤 > 4 月土壤。随着时间的推移土壤的含盐量逐渐降低。土壤的总氮和总磷含量在不同季节的根际与非根际之间差异不显著,但土壤碱解氮的含量在不同季节盐角草植物根际土壤中呈显著性差异( $P < 0.05$ ),并且在土壤根际与非根际之间也存在显著性差异。

### 2.2 测序结果质量分析

由 MiSeq 双端测序所得样品数据经质量控制,去除非靶区域序列、嵌合体、短片段序列等,使得质控后序列长度大部分分布在 310–330 bp 之间,满足序列分析要求。质控后,7 月、10 月、4 月采集的盐角草根际土壤高质量序列数分别为 85734、76159、77910 条,非根际土壤高质量序列数分别为 75505、82739、84269 条。

稀释曲线(rarefaction curve)反映样品的取样深度,可以用来评价测序量是否足以覆盖所有类群。从稀释曲线(图 1)中可知,序列数量到 40000 时各样

表 1. 盐角草植物根际与非根际土壤的理化特性

Table 1. The physic-chemical characteristics of rhizosphere and non-rhizosphere soils of *Salicornia europaea*

Characteristics	S7	S10	S4	SN7	SN10	SN4
pH	8.15±0.19a	7.80±0.08ab	7.68±0.03b	8.18±0.13a	7.71±0.02b	7.81±0.12ab
EC/(ms/cm)	12.40±0.12a	10.25±0.12b	2.80±0.05c	10.15±0.38a	7.76±0.07b	5.58±0.30c
SM/%	11.10±0.18c	13.21±0.24b	14.13±0.70b	13.82±0.21b	16.84±0.41a	12.460±0.559b
AK/(mg/kg)	210.95±0.40b	204.54±0.60c	160.03±0.47e	199.97±0.83d	136.50±0.16f	201.99±0.43a
AP/(mg/kg)	16.23±0.22a	4.35±0.27b	5.09±0.22b	16.60±0.17a	4.50±0.28b	4.33±0.29b
OM/(g/kg)	64.23±0.12b	62.37±0.47c	66.53±0.62a	49.35±0.02d	23.21±0.14e	63.47±0.67bc
AN/(g/kg)	35.17±0.17c	66.03±0.13a	43.30±0.60b	24.63±0.24d	24.95±0.14d	20.80±0.46e
TN/(g/kg)	1.01±0.01a	0.88±0.26a	0.36±0.32a	0.84±0.02a	0.72±0.06a	0.39±0.23a
TK/(mg/kg)	5.36±0.05f	8.90±0.04b	7.21±0.03d	5.56±0.06e	7.96±0.02c	9.52±0.02a
TP/(mg/kg)	0.55±0.03a	0.63±0.25a	0.72±0.08a	0.53±0.01a	0.67±0.02a	0.80±0.06a

S7, S10, S4 are the rhizosphere soil of *Salicornia europaea* in July, October and April, respectively. SN7, SN10, SN4 are non-rhizosphere soil of *Salicornia europaea* in July, October and April, respectively.

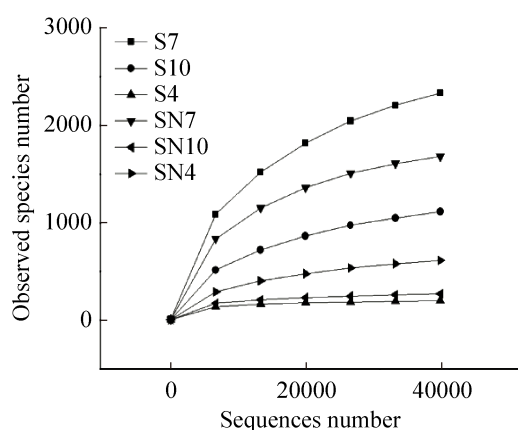


图 1. 不同采样时期盐角草土壤样品的稀释曲线

Figure 1. Dilution curve of soil samples of *Salicornia europaea* at different periods.

品稀释曲线均基本趋于平缓,说明取样基本合理,真实环境中细菌群落结构的置信度较高,能够比较真实地反映土壤样本的固氮微生物群落。

### 2.3 盐角草根际与非根际土壤固氮微生物的多样性

Alpha 多样性是指一个特定区域或生态系统

内的多样性,多样性指数是反映丰富度和均匀度的综合指标<sup>[16]</sup>。其中,群落丰富度指数 Chao1 或 ACE 指数越大,说明群落丰富度越高,由表 2 可以看出盐角草植物根际土壤的固氮微生物群落高于非根际土壤,7月采集土壤高于10月采集土壤和4月采集土壤。Shannon 指数是用来估算样品中微生物多样性指数之一,Shannon 指数越大,说明群落多样性越高,由表 2 可以看出盐角草植物根际的固氮微生物群落多样性高于非根际,在季节上呈现出7月土壤>10月土壤>4月土壤的变化特征。

Goods-coverage 指数是各样本文库的覆盖率,数值越高,表明样品中没有被测出的概率越低。各季节盐角草根际土壤和非根际土壤的文库覆盖度平均值分别达到 99.13%和 99.47%,*nifH* 基因的测序序列条数达到 80000 条,说明样本的取样大小合理,所得的固氮微生物种群信息能够较好地代表真实环境中固氮微生物的多样性。

表 2. 盐角草根际与非根际土壤固氮微生物多样性指数

Table 2. The diversity index of nitrogen fixation gene *nifH* in rhizosphere and non-rhizosphere soils

Sample name	Combined reads	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	Goods-Coverage
S7	88030	8.195	0.984	2690.099	2908.294	0.983
S10	77599	5.152	0.871	1332.937	1398.109	0.992
S4	78619	4.682	0.909	257.273	228.561	0.999
SN7	76189	7.122	0.970	1911.084	1963.205	0.990
SN10	83393	4.768	0.909	308.692	323.562	0.999
SN4	84894	4.441	0.859	798.539	810.023	0.995

花瓣图可以展示多样品相同和各自特有 OTU 数目, 直观展示样品间 OTU 的重叠情况。如图 2 所示, 6 个样品共有的 OTU 的数量为 83, 每个样品特有的 OTU 相对共有 OTU 数量较高。样品 S7 特有 OTU 在 6 个样品中最多, 占样品总 OTU 数 2980 的 48.76%, 样品 S4 占样品总 OTU 数的最低 0.57%。7 月、10 月、4 月土壤样本占比分别为 75.8%、15.1%、6.3%。

## 2.4 不同时期盐角草根际与非根际土壤门水平上的固氮菌群结构组成

根据物种注释结果, 对门水平下的物种进行

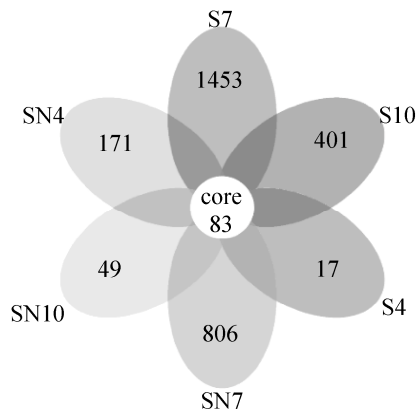


图 2. 不同时期盐角草植物根际与非根际土壤中 *nifH* 多样性的相关性分析

Figure 2. Correlation analysis of *nifH* diversity between rhizosphere and non-rhizosphere soils of *Salicornia europaea* at different periods.

分析发现 S7、S10、S4、SN7、SN10、SN4 中 Others 所占比例分别为 97.53%、98.08%、99.44%、99.29%、99.70%、99.35%。选取门水平下除 Others 的物种相对丰度生成柱状堆积图, 结果如图 3 所示, 以便直观查看各样本相对丰度较高的物种及其比例。艾比湖湿地盐角草植物根际土壤的固氮微生物分属于蓝藻门(*Cyanobacteria*)、变形杆菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、螺旋体门(*Spirochaetes*)、广古菌门(*Euryarchaeota*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和绿菌门(*Chlorobi*)。由图 3 可知艾比湖湿地固氮微生物相对丰度最高的为变形杆菌门(*Proteobacteria*), 相对丰度占比在各样本之间达到 79%、98%、93%、70%、63%、92%。其次为蓝藻门(*Cyanobacteria*), 相对丰度占比在各样本之间达到了 16%、2%、0%、13%、37%、6%。

## 2.5 不同时期盐角草根际与非根际土壤属水平上的固氮菌群结构组成

根据物种注释结果, 对属水平下的物种进行分析发现 S7、S10、S4、SN7、SN10、SN4 中 Others 所占比例分别为 97.93%、98.10%、99.48%、99.42%、99.80%、99.37%。S7、S10、S4、SN7、SN10、SN4 分别有 1104、956、312、288、123、390 个 OTU 注释到属。选取每个分组在属(genus)

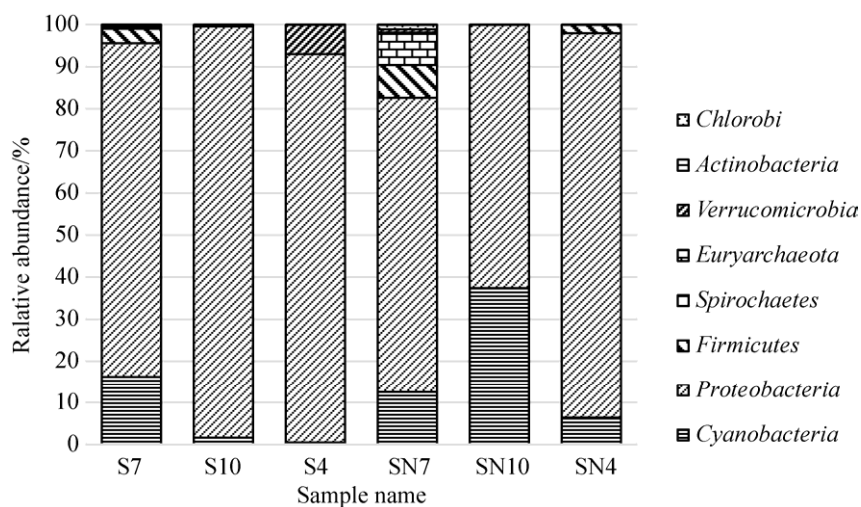


图 3. 不同时期盐角草根际与非根际土壤在门分类水平上 *nifH* 基因的分布

Figure 3. Distribution of *nifH* gene at the Phylum level of rhizosphere and non-rhizosphere soils of *Salicornia europaea* at different periods.

分类水平上除 Others 丰富度排名前 10 的物种, 生成物种相对丰度柱状堆积图, 结果如图 4 所示, 磁螺菌属(*Magnetospirillum*)、土杆菌属(*Geobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、

脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、脱硫杆菌属(*Desulfatibacillum*)、固氮(细)菌属(*Azotobacter*)、外硫红螺旋菌属(*Ectothiorhodospira*)为优势固氮菌属。这些优势菌属隶属于变形菌门(*Proteobacteria*)和蓝藻门(*Cyanobacteria*), 分别占比为 85% 和 10%,

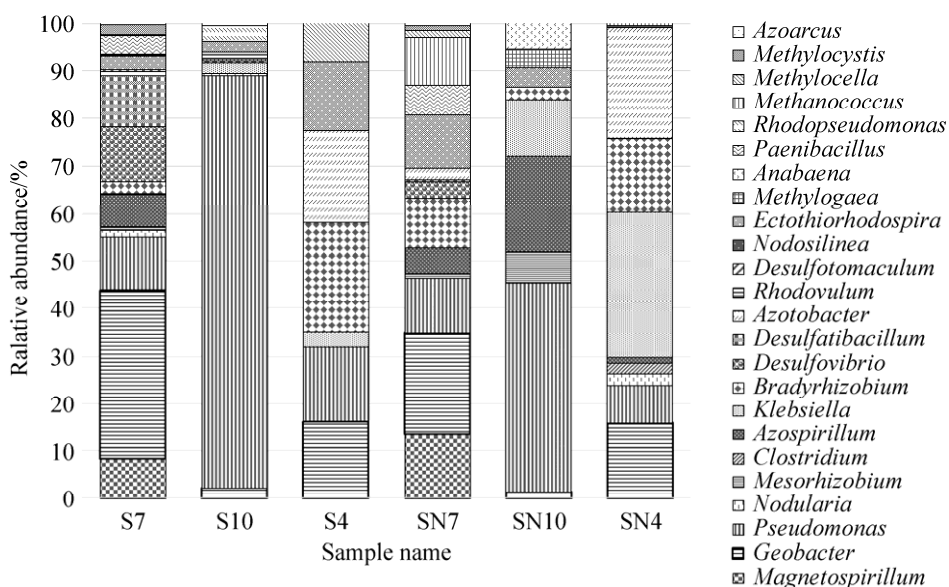


图 4. 不同时期盐角草根际与非根际土壤在属分类水平上 *nifH* 基因的分布

Figure 4. Distribution of *nifH* gene at the genus level of rhizosphere and non-rhizosphere soils of *Salicornia europaea* at different periods.

其余各菌门总占比为 5%。优势菌属在不同季节植物根际与非根际土壤之间存在差异，由图 3 可知在 7 月根际与非根际土壤的优势种属类别最多，且各优势属的相对丰度差异较小，土杆菌属和假单胞菌属为 7 月盐角草土壤的优势固氮菌属，其在根际与非根际土壤优势固氮菌属的相对丰度分别为 35%、21% 和 11%、12%；10 月根际与非根际土壤的优势种属类别最少，假单胞菌属为 10 月土壤的优势菌属，其在根际土壤优势菌属的相对丰度达到了 87%，在非根际土壤中为 44%。4 月根际与非根际土壤的优势种属为慢生根瘤菌属、固氮菌属、假单胞菌属和土杆菌属，其相对丰度相差较小。

## 2.6 土壤固氮微生物群落结构与环境因子的相关性分析

RDA 分析是为了检测微生物群落组成与环境变量之间的关系。图 5、图 6 分别表示了不同时期

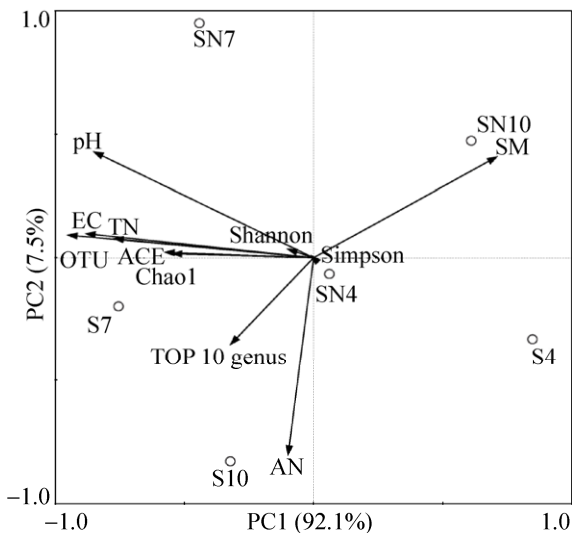


图 5. 不同时期盐角草根际与非根际土壤理化因子与 *nifH* 多样性之间的 RDA 分析

Figure 5. RDA analysis of physicochemical factors and *nifH* diversity in rhizosphere and non-rhizosphere soils of *Salicornia europaea* at different periods.

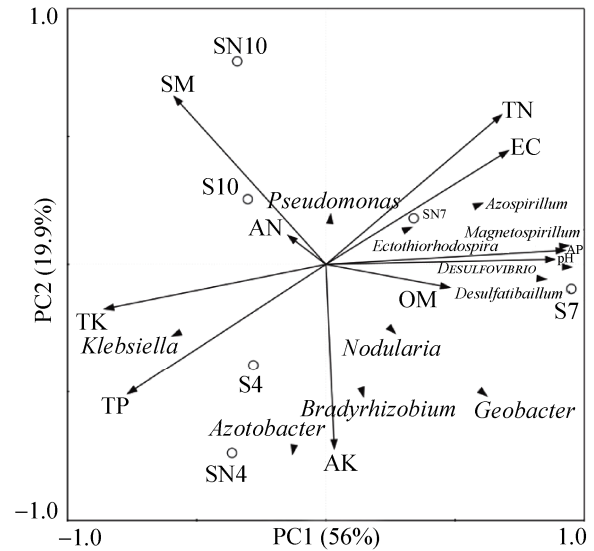


图 6. 不同时期盐角草根际与非根际土壤优势固氮菌与土壤环境因子的 RDA 分析

Figure 6. RDA analysis of dominant nitrogen fixing bacteria and physicochemical factors in rhizosphere and non-rhizosphere soil of *Salicornia europaea* at different periods.

盐角草根际与非根际土壤固氮菌群多样性指数与环境因子的相关性分析以及不同时期土壤固氮菌优势菌群与土壤环境因子的相关性。图 5 RDA 结果中横轴解释了总变异的 92.1%，纵轴 PC2 解释了总变异的 7.5%。由图可知，Chao1、Ace 指数和 Shannon、Simpson 指数与 EC、TN、pH 均呈显著性正相关，土壤中固氮微生物优势属(TOP 10 genus)与 EC、TN、AN 呈正相关；OTU 数量，Chao1、Ace 指数，Shannon、TOP 10 genus 与 SM 均呈负相关。图 6 RDA 结果中横轴解释了总变异的 56%，纵轴 PC2 解释了总变异的 19.9%。盐角草植物根际与非根际土壤中固氮微生物的优势属假单胞菌属的 OTU 数量与 AN、SM、TN、EC 呈显著性相关，而优势菌土杆菌属、慢生根瘤菌属 OTU 的数量与 OM、AK 呈显著性相关，克雷伯氏菌属 OTU 的数量与 TP、TK 呈显著性正相

关, 其余优势菌属的数量均与环境因子存在一定的相关性。

### 3 讨论

#### 3.1 艾比湖湿地不同时期建群植物盐角草根际与非根际土壤固氮微生物 *nifH* 多样性和丰富度的特征

固氮微生物直接影响着土壤固氮效率高低和氮素循环的正常运转<sup>[17]</sup>。本研究分析发现, 盐角草植物根际与非根际土壤不同时期固氮微生物群落结构的多样性和丰富度之间存在差异, 根际土壤的固氮微生物 *nifH* 基因多样性高于非根际土壤, 7 月的土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性高于 10 月和 4 月的土壤。这可能是因为不同的生态环境因子会影响土壤微生物的活性, 特别是固氮微生物<sup>[18]</sup>。艾比湖湿地盐角草植物根际土壤的固氮微生物群落多样性高于非根际土壤, 这与已有的研究结果相符, 如 Zhang 等<sup>[19]</sup>对三江源地区不同植被土壤固氮微生物的群落结构研究发现植被是影响土壤固氮微生物的主要因素之一。沈秋兰等对阔叶林改种毛竹后土壤固氮细菌 *nifH* 基因多样性变化的研究发现植被是土壤微生物赖以生存的有机营养物质和能量的来源, 影响着微生物的定居环境<sup>[20]</sup>。大量研究表明, 根际效应对土壤微生物活性有着强烈影响, 包括氮循环等微生物学过程<sup>[21]</sup>。这可能与 Neumann 等<sup>[22]</sup>研究中提到的盐角草植物养分的吸收、根系分泌物释放及根际微生物代谢活动等多过程同时发生有关。盐角草土壤的固氮菌群落多样性在不同采样时间呈现出了季节性差异, 7 月采集的土壤固氮菌归属于蓝藻门、变形杆菌门、厚壁菌门、螺旋体门、广古菌门、疣微菌门、放线菌门和绿菌门, 10 月和 4 月采集

的土壤固氮菌归属于蓝藻门、变形杆菌门、厚壁菌门, 7 月土壤固氮菌群落多样性高于 10 月和 4 月的土壤。变形杆菌门、蓝藻门为艾比湖湿地盐角草植物根际土壤的优势菌门, 本研究中, 变形杆菌门在盐角草群落根际非根际土壤是最主要固氮微生物, 蓝藻次之。这之前一些研究者发现土壤中主要固氮微生物为蓝藻及其发挥着主要的固氮作用的结论有不同之处<sup>[23]</sup>。

#### 3.2 固氮微生物群落结构多样性和丰富度在盐角草根际和非根际土壤中的环境异质性特点

土壤的理化性质结果显示, 土壤电导率在各季节之间存在显著差异, 随着时间的推移, 土壤的含盐量在逐渐降低。王彦芹等<sup>[18]</sup>指出, 泌盐植物盐角草能通过离子区隔化和泌盐作用使得周围土壤盐量在 2 年内下降 1% 以下。同时这也可能与政府的退耕还林政策有关, 使得土壤的盐渍化有了一定的改善。盐角草土壤的 pH 变化范围为 7.71–8.18, 其在植物的根际与非根际土壤间差异性不大, 但通过分析发现磁螺菌属与环境 pH 呈显著正相关。在陆地沉积物中磁螺菌属细菌的最适温度为 22–30 °C, 最适 pH 为 6.5–6.7, 但本实验中土壤的 pH 值变化范围为 7.71–8.18, 属于盐碱性土壤, 依然有磁螺菌属细菌发现, 可能因为具有固氮功能的磁螺菌属细菌为了在含盐量较高的艾比湖湿地生存其生理特征发生了相应的改变。但结合往年数据可以发现, 艾比湖湿地土壤的酸碱度在逐渐降低, 这说明近年的生态保护工作初见成效。固氮螺菌属与全氮、电导率、有效磷、酸钾度和有机质含量均有显著相关性, 说明固氮螺菌属细菌的多样性会随着环境发生变化, 同时发现在 7 月时固氮螺菌属细菌的相对丰度最高。这与它的生理特性相关, 固氮螺菌属细菌是在热



带植物根际进行固氮作用的联合固氮菌, 必须生活在植物根际、叶面或动物肠道等处才能固氮的原核生物, 其最适生长温度在 35–40 °C 之间, 盐度范围为 0.5%–166.0%<sup>[24]</sup>。而艾比湖湿地夏季 7 月时的高温和土壤的高盐度的生长环境很符合固氮螺菌属细菌的生长。

对比土壤中其他理化因子的含量, 根际土壤明显高于非根际土壤。表明盐角草根际土壤的微环境在肥力水平上要优于非根际土壤。何园等<sup>[25]</sup>的研究表明根际丰富的有机质矿化后将为微生物提供各种不同的代谢底物, 也会刺激着各种微生物的生长。研究表明盐角草适应于盐碱、干旱的土壤, 这些因素使得其根际微环境显著不同于周围土壤环境。同时植物根系分泌物可为微生物提供足够的能源<sup>[26]</sup>。该试验中根际土壤固氮微生物的丰富度远远大于非根际土壤, 也证实了根际分泌物中存在能够促进固氮作用的物质这一结果。

## 4 结论

艾比湖湿地盐角草植物根际土壤的固氮微生物多样性高于非根际土壤, 7 月的土壤固氮微生物多样性高于 10 月和 4 月的土壤。

艾比湖湿地盐角草植物根际土壤的 *nifH* 优势菌隶属于变形菌门 (*Proteobacteria*) 和蓝藻门 (*Cyanobacteria*), 分别占比为 85% 和 10%, 其余各菌门总占比为 5%。土杆菌属 (*Geobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、固氮(细)菌属 (*Azotobacter*) 和慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 等为盐角草土壤中固氮微生物优势菌属。

随着时间的推移土壤样本中固氮微生物的多样性和群落结构也发了改变, 在季节上呈现出 7 月采集的土壤 > 10 月采集的土壤 > 4 月采集的土壤

的变化特征。同一时期植物根际与非根际土壤中固氮微生物的群落结构并不相同, 盐角草植物根际土壤固氮微生物群落多样性高于非根际土壤。RDA 分析表明微生物的群落结构的多样性与环境因子显著相关。

本文揭示了不同时期艾比湖湿地建群植物盐角草根际与非根际土壤固氮微生物群落结构的构成和丰富度, 以期探讨微生物群落在湿地生态功能恢复过程中潜在的作用, 为今后的湿地保护工作提供数据基础和理论参考。

## 参考文献

- [1] Zhang QL, Lin M, Ping SZ. Biological nitrogen fixation and its application in sustainable agriculture. *Biotechnology Bulletin*, 2008, (2): 1–4. (in Chinese)  
张秋磊, 林敏, 平淑珍. 生物固氮及在可持续农业中的应用. *生物技术通报*, 2008, (2): 1–4.
- [2] Kang WL, Tai XS, Li SW, Dong K, Liu GX, Zhang W. Research on the number of nitrogen-fixing microorganism and community structure of nitrogen-fixing (*nifH*) genes in the alkali soils of alpine steppe in the Qilian Mountains. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2013, 35(1): 208–216. (in Chinese)  
康文龙, 台喜生, 李师翁, 董康, 刘光琇, 张威. 祁连山高寒草原碱性土壤固氮微生物数量及固氮基因 (*nifH*) 群落结构研究. *冰川冻土*, 2013, 35(1): 208–216.
- [3] Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(7): 539–554.
- [4] Terakado-Tonooka J, Ohwaki Y, Yamakawa H, Tanaka F, Yoneyama T, Fujihara S. Expressed *nifH* genes of endophytic bacteria detected in field-grown sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.). *Microbes and Environments*, 2008, 23(1): 89–93.
- [5] Tan ZY, Peng GX, Xu PZ, Ai SY, Tang SH, Zhang GX, Zeng FY. Diversity and high nitrogenase activity of endophytic diazotrophs isolated from *Oryza rufipogon* Griff. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54(16): 2839–2848.

- [6] Zhang J, Zhang HW, Li XY, Su ZC, Zhang CG. Soil microbial ecological process and microbial functional gene diversity. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(6): 1129–1132. (in Chinese)  
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. *应用生态学报*, 2006, 17(6): 1129–1132.
- [7] Li G, Wang LJ, Li YJ, Qiao J, Zhang HF, Song XL, Yang DL. Effects of different vegetation restoration patterns on the diversity of soil nitrogen-fixing microbes in Hulunbeier sandy land, Inner Mongolia of North China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(6): 1639–1646. (in Chinese)  
李刚, 王丽娟, 李玉洁, 乔江, 张海芳, 宋晓龙, 杨殿林. 杨殿林呼伦贝尔沙地不同植被恢复模式对土壤固氮微生物多样性的影响. *应用生态学报*, 2013, 24(6): 1639–1646.
- [8] Liu L, He XY, Du H, Wang KL. The relationships among nitrogen-fixing microbial communities, plant communities, and soil properties in karst regions. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(12): 4037–4044. (in Chinese)  
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. *生态学报*, 2017, 37(12): 4037–4044.
- [9] Xu HH, Zeng CS, Wang WQ, Zhai JH. Study on vertical distribution and the influencing factors of soil organic carbon in Ebinur Lake wetland. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*, 2010, 26(5): 86–91. (in Chinese)  
徐欢欢, 曾从盛, 王维奇, 翟继红. 艾比湖湿地土壤有机碳垂直分布特征及其影响因子分析. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 26(5): 86–91.
- [10] Zhu HQ, Li YH, Li FD. Seasonal variations of soil enzyme activities in typical plant communities in the Ebinur Lake wetland, China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(4): 1145–1154. (in Chinese)  
朱海强, 李艳红, 李发东. 艾比湖湿地典型植物群落土壤酶活性季节变化特征. *应用生态学报*, 2017, 28(4): 1145–1154.
- [11] Nie LL, Feng JJ, Lü SL, Jiang P, Fan PX, Tai F, Li YX. The response of euhalophyte *Salicornia europaea* L. to different nitrogen forms. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(18): 5703–5712. (in Chinese)  
聂玲玲, 冯娟娟, 吕素莲, 江萍, 范鹏祥, 台方, 李银心. 真盐生植物盐角草对不同氮形态的响应. *生态学报*, 2012, 32(18): 5703–5712.
- [12] Yang D, Hu WG, Chen DW, Dong YY, Wang YP, Han J. Correlation analysis between nitrogen-fixing bacteria number and organic matter, microbial biomass C, N in different soil depth and seasons of Ebinur Lake wetland. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 26(6): 2417–2421. (in Chinese)  
杨迪, 胡文革, 陈登稳, 董艳艳, 王艳萍, 韩晶. 艾比湖湿地固氮菌数量与有机碳、微生物生物量 C、N 在时空分布上的相关性研究. *西南农业学报*, 2013, 26(6): 2417–2421.
- [13] Wang HL, Zhang HG, Qin L, Ma HY, Lü GH. The characteristics of the spatial distribution of soil organic matter and factors influencing it in Ebinur Lake Basin of Xinjiang Autonomous Region, China. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(16): 4969–4980. (in Chinese)  
王合玲, 张辉国, 秦璐, 马辉英, 吕光辉. 新疆艾比湖流域土壤有机质的空间分布特征及其影响因素. *生态学报*, 2012, 32(16): 4969–4980.
- [14] Qian YB, Jiang J, Wu ZN. Soil heterogeneity and its impact on ecological distribution of plant community in the Aiby lake area. *Arid Land Geography*, 2003, 26(3): 217–222. (in Chinese)  
钱亦兵, 蒋进, 吴兆宁. 艾比湖地区土壤异质性及其对植物群落生态分布的影响. *干旱区地理*, 2003, 26(3): 217–222.
- [15] Lu RK. Analytical method of soil agricultural chemistry. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999. (in Chinese)  
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.
- [16] Wu JN, Liu YX, Zhou X, Wang TY, Gao Q, Gao YH, Liu SX. Effects of long-term different fertilization on soil fungal communities in black soil based on the Illumina MiSeq platform. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(9): 1658–1671. (in Chinese)  
武俊男, 刘昱辛, 周雪, 王天野, 高强, 高云航, 刘淑霞. 基于 Illumina MiSeq 测序平台分析长期不同施肥处理对黑土真菌群落的影响. *微生物学报*, 2018, 58(9): 1658–1671.
- [17] Zou YK, Zhang JN, Yang DL, Chen XR, Zhao JN, Xiu WM, Lai X, Li G. Effects of different land use patterns on *nifH* genetic diversity of soil nitrogen-fixing microbial

- communities in *Leymus chinensis* steppe. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(3): 150–156.
- [18] Wang YQ, He JZ, Zhao XL, Zhang HY, Deng F, Jia XY, Liu C. Comparison of salt-tolerance and drought-tolerance of two desert plants (*Karelinia caspica* and *Suaeda turkestanica* Litw.) in Tarim. *Genomics and Applied Biology*, 2009, 28(6): 1128–1134. (in Chinese)  
王彦芹, 贺江舟, 赵小亮, 张海燕, 邓芳, 贾晓宇, 刘陈. 塔里木盆地荒漠植物花花柴和碱蓬耐盐、耐旱性比较. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(6): 1128–1134.
- [19] Zhang YG, Wang HM, Li DQ, Xiao QM, Liu XD. The community and structure of nitrogen-fixing microorganism in Sanjiangyuan natural reserve. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(3): 420–425. (in Chinese)  
张于光, 王慧敏, 李迪强, 肖启明, 刘学端. 三江源地区不同植被土壤固氮微生物的群落结构研究. 微生物学报, 2005, 45(3): 420–425.
- [20] Shen QL, He DH, Xu QF, Cheng M, Mao XW, Li YC, Chen JH. Variation of *nifH* gene diversity of soil nitrogen-fixing bacteria in Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) plantation converted from broadleaf forest. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2016, 22(3): 687–696. (in Chinese)  
沈秋兰, 何冬华, 徐秋芳, 程敏, 毛新伟, 李永春, 陈俊辉. 阔叶林改种毛竹(*Phyllostachys pubescens*)后土壤固氮细菌 *nifH* 基因多样性的变化. 植物营养与肥料学报, 2016, 22(3): 687–696.
- [21] Yeager CM, Kuske CR, Carney TD, Johnson SL, Ticknor LO, Belnap J. Response of biological soil crust diazotrophs to season, altered summer precipitation, and year-round increased temperature in an arid grassland of the Colorado Plateau, USA. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 358.
- [22] Neumann G, Romheld V. Root-induced changes in the availability of nutrients in the rhizosphere. *Cheminform*, 2003, 34(4): 617–649.
- [23] Wang J, Bao JT, Li XR, Liu YB. Molecular ecology of *nifH* genes and transcripts along a chronosequence in revegetated areas of the Tengger desert. *Microbial Ecology*, 2016, 71(1): 150–163.
- [24] Chen MH, Sheu SY, James EK, Young CC, Chen WM. *Azoarcus olearius* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(10): 3755–3761.
- [25] He Y, Hu WG, Ma DC, Yang Y, Lan HZ, Gao Y. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing microorganisms in relation to soil environment in rhizosphere soil of *Halocnemum strobilaceum* in Ebinur Lake wetland. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37(5): 1967–1975. (in Chinese)  
何园, 胡文革, 马得草, 杨扬, 兰鸿珠, 高岩. 艾比湖湿地盐节木根际土壤氨氧化微生物多样性和丰度及其与环境因子的相关性分析. 环境科学学报, 2017, 37(5): 1967–1975.
- [26] Zhang F, Shen J, Li L, Liu X. An overview of rhizosphere processes related with plant nutrition in major cropping systems in China. *Plant and Soil*, 2004, 260(1/2): 89–99.

# Diversity of soil nitrogen-fixing microorganisms in *Salicornia europaea* community of Ebinur Lake wetland during different periods

Xitong Jin, Wenge Hu<sup>\*</sup>, Shuaibing He, Tingting Zhou, Yuee Wang, Zhentao Zhong

College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

**Abstract:** [Objective] The primary goal of this study was to explore the correlation between the diversity and abundance of nitrogen-fixing microbes and the physicochemical factors of rhizosphere and non-rhizosphere soil types during different seasons. We aimed to explore the potential role of nitrogen-fixing microbial communities in restoring ecological functions. This study may provide the theoretical foundation and preliminary data for future studies in this field. [Methods] Illumina HiSeq PE250 sequencing technique was used to analyze the diversity of nitrogen-fixing microorganisms in six different soil samples. RDA analysis was used to explore the correlation between the physicochemical factors and the structure and abundance of nitrogen-fixing microbial communities in these soil samples. [Results] The diversity of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere soil was higher than that in non-rhizosphere soil. Additionally, the diversity observed in July was higher than that in October and April. Bacteria belonging to the genera *Geobacter*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* and *Bradyrhizobium* were predominant in *Salicornia europaea* rhizosphere and non-rhizosphere soils. The predominant phyla of nitrogen-fixing microorganisms were *Proteobacteria* and *Cyanobacteria*, whose relative abundance accounted for 85% and 10%, respectively, while the others accounted for less than 5%. The predominant nitrogen-fixing microflora in the soil was significantly correlated with alkali-hydrolyzed nitrogen (AN), total nitrogen (TN), available potassium (AK), and total phosphorus (TP). [Conclusion] The diversity and community structure of nitrogen-fixing microorganisms in soil samples varied in different seasons. The community structure of nitrogen-fixing microorganisms was different in rhizosphere and non-rhizosphere soil types during the same period. These experimental results may provide the theoretical foundation and preliminary data for the restoration of Ebinur Lake wetland.

**Keywords:** Lake Ebinur wetland, nitrogen-fixing gene (*nifH*), diversity of nitrogen fixation microorganisms, physic-chemical factors

(本文责编: 李磊)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31160026, 31560040)

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: hwg-t@163.com

Received: 29 December 2018; Revised: 8 March 2019; Published online: 13 June 2019