植物营养与肥料学报 2013,19(1):82-92
Plant Nutrition and Fertilizer Science doi:10.11674/zwyf.2013.0110

太湖地区长期不同施肥水稻土 N_2 和 CO_2 固定细菌群落结构的特征与差异

靳振江[1,2],潘根兴[1*],刘晓雨[1],李恋卿[1]
(1 南京农业大学农业资源与生态环境研究所,江苏南京 210095;
2 桂林理工大学环境科学与工程学院,广西桂林 541004)

摘要:土壤 N_2 固定细菌和 CO_2 固定细菌是土壤碳氮循环重要的微生物群落,不同施肥下土壤有机碳积累与这两类微生物群落结构及活性的关系有助于了解施肥对农田碳氮循环的影响特点。本文研究了太湖地区自 1987 年开始的水稻土长期施肥试验,选取不施肥(NF)、氮磷钾(NPK)肥(CF)、NPK 肥与猪粪配施(CFM)和 NPK 肥与秸秆还田配施(CFS)小区,采集(0—20 cm)表层样本,以 *nifH* 和 *cbbL*R 基因分别作为 N_2 和 CO_2 固定细菌的指示基因,用 PCR-DGGE 和荧光定量 PCR 的方法研究二者的群落结构,并用平板菌落计数法测定土壤自生固氮细菌数量和用乙炔还原法测定土壤固氮酶活性。结果表明,与 CF 处理相比,CF、CFM 和 CFS 处理下的自生固氮细菌数量分别提高了 58%、66% 和 106%;CF、CFM 和 CFS 处理下的 *nifH* 基因丰度分别提高了 213%、1079 % 和 344%。CF 与 CFM 处理的土壤固氮酶活性显著高于 NF 和 CFS 处理。因此,施肥提高了 *cbbL*R 基因的多样性。与 NF 处理相比,CF、CFM 和 CFS 处理下的 *cbbL*R 基因丰度分别提高了 465%、1827% 和 758%。相关性分析表明,土壤自生固氮菌数量与土壤有机碳含量呈显著正相关,*cbbL*R 和 *nifH* 基因丰度均与归一化的土壤养分呈极其显著正相关。研究表明,有机/无机肥配施下土壤养分平衡对维持 N_2 和 CO_2 固定细菌较高的丰度具有重要的作用。

关键词:施肥;N_2 固定;CO_2 固定;细菌群落;养分平衡;有机碳
中图分类号:S154.3 **文献标识码**:A **文章编号**:1008-505X(2013) 01-0082-11

Community structure characters and differences of N_2-fixing and CO_2-fixing bacteria under long-term fertilization in paddy soils of Taihu Lake region, China

JIN Zhen-jiang[1,2], PAN Gen-xing[1*], LIU Xiao-yu[1], LI Lian-qing[1]
(*1 Institute of Agricultural Resources, Ecosystem and Environment, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;*
2 College of Environmental Engineering and Science, Guilin University of Technology, Guilin, Guangxi 541004, China)

Abstract: Both CO_2-fixing and N_2-fixing bacteria are important microbes involved in soil carbon and nitrogen cycles, respectively. It is helpful for us to know the effect of fertilization on carbon and nitrogen cycles in farmland soils and to analyze the relationship between the soil organic carbon (SOC) and community structures of N_2-fixing and CO_2-fixing bacteria. The topsoil (0-20 cm) samples were collected from a paddy field under a long-term different fertilization trials initiated in 1987 from Taihu Lake region, China. There were four treatments, no fertilizer application (NF), application of NPK fertilizers only (CF), combined application of NPK fertilizers and pig manure (CFM) and combined application of NPK fertilizers and straw return (CFS). Community structures were analyzed using PCR-DGGE and real-time PCR with *nifH* gene and *cbbL*R gene as indicators of N_2-fixing and CO_2-fixing bacteria, respectively. Cloning forming unit (CFU) of autotrophic azotobacter was evaluated using plating colony-counting method. Nitrogenase activity was detected using acetylene reduction method as well. The results show that the abundances of *nifH* gene in the CF treatment, CFM treatment and CFS treatment are increased

收稿日期:2012-07-16 **接受日期**:2012-09-26
基金项目:国家自然科学基金重点项目(40830528);国家自然科学基金委国际合作重大项目(40710019002)资助。
作者简介:靳振江(1974—),男,山西长治人,博士研究生,副教授,主要从事生态学和环境微生物学方面的研究。
E-mail:zhenjiangjinjin@163.com。 *通信作者 E-mail:pangenxing@yahoo.com.cn, E-mail:gxpan@njau.edu.cn

by 213%, 1079 % and 344%, respectively compared with the NF treatment, and CFUs of autotrophic azotobacter are increased by 58%, 66% and 106%. Nitrogenase activities in CF and CFM treatments are significantly higher than those in NF and CFS treatments. The diversity of *cbbL*R gene is increased after the fertilizer application. The abundances of *cbbL*R gene in the CF treatment, CFM treatment and CFS treatment are increased by 465%, 1827% and 758%, respectively compared with the NF treatment. The statistical analysis reveals there are significant correlations between the two abundances and soil nutrient richness normalized (SNRN) of SOC, total nitrogen (TN) and total phosphorus (TP) and between the CFU of autotrophic azotobacter and SOC. These results indicate that nutrient balances of the combined inorganic/organic fertilization treatments can preserve higher abundances of N_2-fixing and CO_2-fixing bacteria.

Key words: fertilization; N_2-fixing; CO_2-fixing; bacterial community; nutrient balance; SOC

合理的施肥可以促进稻田土壤有机碳积累,这不仅能够提高作物产量,而且对减缓气候变化也有一定的贡献[1-3]。同时,施肥又是驱动农田土壤微生物群落结构演变的一个重要因子[4],这已被来自稻田长期试验的研究结果所证实,即在不同的施肥措施下,土壤微生物群落结构的演化方向不同[5-7]。近年来,有关功能微生物菌群在不同施肥条件下的变化研究较多,它们往往比细菌或真菌更能够很好地反映不同施肥措施对土壤有机碳等养分含量的影响。

在多种多样的功能菌群中,CO_2 固定细菌和 N_2 固定细菌是代谢途径比较独特的两大类群。其中,CO_2 固定细菌是由能通过多种代谢方式固定生境中 CO_2 的多种细菌群落组成的功能菌群[8],其中包括光能自养菌、化能自养菌和异养菌[9]。这一类功能菌群因其体内含有核酮糖 -1,5 - 二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase, rubisco)因而能够同化环境中的 CO_2,并最终能够归还到土壤中成为有机质[10]。CO_2 固定细菌一般分为 Green-like 细菌和 Red-like 细菌两大类群,Rubisco 的部分编码基因 *cbbL*R 和 *cbbL*G 分别被作为二者的指示基因。Selesi 等对德国一个长期施肥下种植牧草的土壤研究表明,施用农家肥与化肥均增加了 cbbL 基因多样性,且 *cbbL*R 比 *cbbL*G 的序列多样性更高,但施肥类型与序列多样性之间没有相关性[11]。Miltner 等用上述试验点中无肥处理土壤的培养试验结果表明,添加易利用的碳源,增强了土壤微生物对 CO_2 的固定作用[12]。Tolli 等对美国的森林土壤与农田土壤的比较分析结果表明,两种生态系统土壤中 CO_2 固定细菌的群落结构差异较大,推测可能与不同土地利用类型和植被类型引起的土壤含水量、温度与有机碳差异有关[13]。最近,Yuan 等对中国南方红壤水稻土长期施肥试验的多点整合研究表明,氮磷钾(NPK)配施与 NPK 配施秸秆还田均提高了 CO_2 固定细菌丰度和 Rubisco 活性,而且,土壤有机碳与 pH 是影响 CO_2 固定细菌群落组成、丰度和 Rubisco 活性的重要因子[14]。

N_2 固定细菌是由能固定环境中 N_2 的多种细菌组成的功能菌群,其中包括自生固氮、共生固氮和联合固氮等多种固氮形式,这一类功能菌群因其体内含有固氮酶(nitrogenase)因而能够同化 N_2 为自身的生物量氮,并最终释放到土壤中,成为土壤氮库的一部分。长期施肥试验的研究表明,在东北黑土小麦-大豆-玉米轮作土壤中,施用无机肥与有机肥均可提高培养固氮菌数量[15],在江西红壤种植玉米土壤中,总氮、速效磷、土壤有机碳与总钾含量是影响固氮菌多样性的重要因子[16]。然而,在辽河平原大豆-玉米-玉米轮作的潮棕壤上,有机肥、无机肥与有机无机肥配施等多种施肥均降低了微生物的固氮活性,且固氮活性与土壤有机碳、全氮、硝态氮和速效钾含量呈显著负相关[17]。

综上所述,对长期施肥条件下土壤 N_2 固定细菌与 CO_2 固定细菌的群落结构与功能影响的研究相对较少。而且受不同种植制度、土地利用方式和土壤类型多个土壤因子影响,这两类功能细菌群落结构及其功能与有机碳之间关系差异较大,甚至出现相反的研究结果,很难从中总结或推论出共性的结论。因此有必要进行不同土壤类型下施肥与这两大类功能群落多样性变化之间的关系研究。

选择太湖地区一个长期施肥试验点作为研究样点,本研究在此试验点,水稻土的有机碳含量在长期 NPK 肥、NPK 肥与猪粪配施和 NPK 肥与秸秆还田配施等措施下已经有了显著积累[2]。而且总细菌群落[7]与甲烷氧化菌群落[18]的多样性和真/细菌比[19]也随着有机碳的积累而提高。在此基础上,本研究假设,在长期施肥下,CO_2 固定细菌和 N_2 固定

细菌群落结构多样性将随着土壤有机碳的积累而提高。为验证这个假设,以 *cbbL*R 基因和 *nifH* 基因分别作为 CO_2 固定细菌和 N_2 固定细菌的特异指示基因,采用 PCR-DGGE 与荧光定量技术,并结合平板菌落计数与乙炔还原法分别测定自生固氮细菌数量和土壤固氮酶活性,以研究两大类细菌群落结构的变化特征。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

本研究的采样点为长期施肥试验点,该点建于1987年,位于江苏省吴江市金家坝镇(N 31°05′900″、E 120°46′924″)。该地区属亚热带季风气候,年均气温22°C。土壤类型为黄泥土,试验期间一直为稻(*Oryza sativa*)-油(*Brassica campestris*)轮作,4个不同的长期施肥处理分别为不施肥(NF)、氮磷钾(CF)、氮磷钾配施秸秆(CFS)和氮磷钾配施猪粪(CFM)。小区面积70 m^2(10 m×7 m),设置3个重复。氮肥(尿素)在水稻季施55%,在油菜季施45%。磷肥和钾肥只在油菜季施,猪粪和秸秆在水稻收割后一次性施入。每个处理小区独立进行灌溉和排水。施肥情况见表1,施肥后的土壤理化性质如表2所示。

表1 长期试验点的施肥情况

Table 1 Fertilizer treatments in the long-term experimental site

处理 Treatment	施肥量 Fertilizer rate [kg/(hm^2 · a),FW]				
	秸秆 Straw	猪粪 Pig manure	N	P_2O_5	KCl
NF	0	0	0	0	0
CF	0	0	28.5	3.0	5.6
CFM	0	1120	28.5	3.0	5.6
CFS	300	0	28.5	3.0	5.6

表2 土壤特性及微生物量碳和微生物量氮含量

Table 2 Soil properties and soil microbial biomass carbon and nitrogen

处理 Treatment	pH (H_2O)	有机碳[1] SOC (g/kg)	全氮[1] Total N (g/kg)	总磷[2] Total P (g/kg)	微生物量碳[1] Soil micro biomass carbon (mg/kg)	微生物量氮[1] Soil microbiomass nitrogen (mg/kg)
NF	5.66	16.48 c	1.59	0.24	319.29	12.70
CF	5.46	17.96 b	1.59	0.37	388.09	46.32
CFM	5.34	18.04 b	1.78	0.72	459.56	38.37
CFS	5.16	19.29 a	1.86	0.37	507.73	47.70

注(Note):数据1与数据2分别来自文献[19]与文献[18] Data 1 and data 2 are from references 19 and 18, respectively.

1.2 样品采集

于2009年6月8日于油菜收割后采集土壤样品,在每个小区内用荷兰 Eijkelkamp 不锈钢土芯采样器钻取0—20 cm 表层土样。每个小区随机采集3个等量样本,田间均匀混合为1个样本,当天带回实验室,除去植物残体和入侵体,过2 mm 筛,储放于-70 ℃低温冰箱中备用。

1.3 测定方法

1.3.1 微生物数量的测定 好气性自生固氮菌数量采用平板菌落计数法[20],培养基为 Ashby 培养基,以每克干土中的菌落数(cfu/g)表示。

1.3.2 土壤微生物分子生态分析

1)基因组 DNA 提取 采用 Mo BIO 公司的 DNA 快速提取试剂盒(power soil)提取土壤微生物总 DNA,步骤按操作说明进行。

2)聚合酶链反应(PCR) *nifH* 基因的扩增引物对[21]的正向引物为 PolF(5′- TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC -3′)和反向引物为 PolR(5′- ATS

GCC ATC ATY TCR CCG GA -3′),为了防止扩增的片段在变性梯度凝胶电泳过程中提前解链,需要在正向引物 PolF 的 5′末端加一个长为 40 个碱基的 GC 序列[22]。扩增条件为 95 ℃ 预变性 5 min,然后在 95 ℃变性 1 min,48 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 2 min,共 30 个循环,最后再在 72 ℃ 延伸 10 min。电泳结束后,在 1% 的琼脂糖凝胶电泳中检测 PCR 产物长度的正确性。

*cbbL*R 基因的扩增引物对[11]的正向引物为 *cbbL*RF (5′- AAG GAY GAC GAG AAC ATC -3′),反向引物为 *cbbL*RintR (5′- TGC AGS ATC ATG TCR TT -3′)(Y 代表简并碱基 C 或 Y, S 代表简并碱基 C 或 G, R 代表简并碱基 G 或 A)。同样,正向引物 *cbbL*RF 的 5′末端一个加长为 40 个碱基的 GC 序列[22]。*cbbL*R 基因扩增的 PCR 反应体系与 *nifH* 基因相同,扩增条件 95℃预变性 15 min,91℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,共 40 个循环; 然后在 68℃完全延伸 10 min。在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳中检测 PCR 产物长度正确性。

3) DGGE 对 *cbbL*R 基因而言,变性梯度从上到下是 50% 到 70%。先在 200V 电压与 60 ℃恒温下于 1 倍 TAE 缓冲液(1.0 × Tris-acetate-EDTA buffer)中预电泳 4 min,然后在 160 V 的电压下于 60 ℃电泳 540 min。对 *nifH* 基因而言,变性梯度从上到下是 45 % 到 65 %。预电泳 4 min,然后在 140 V 电压于 60 ℃电泳 800 min。电泳完毕后,将凝胶在固定液中固定 3 min,用银染液染色 10 min,然后用蒸馏水洗涤 2 次,再加显影液显影 3 min; 将染色后的凝胶用 Bio-RAD 的 Gel Doc-2000 凝胶影像分析系统拍照; 用 Quantity One 分析软件(Bio-Rad Laboratories, U. S. A.)帮助确定样品电泳条带的多少、亮度峰值和相似性值。香农-威纳多样性指数、Margalef 丰富度和均匀度计算方法均参照文献[23]进行。具体如下:

$$\text{香农-威纳多样性指数}(H') = -\sum p_i \ln p_i$$

$$\text{Margalef 丰富度}(D_{Mg}) = \frac{(S-1)}{\ln N}$$

$$\text{均匀度}(E) = \frac{H'}{\ln S}$$

其中: S 是可操作分类单元(Operational taxonomic units, OTUs)的总数,在 DGGE 图谱中每一条清晰条带(克隆)被计作一个 OTU,N 是在每个泳道中所有 OUT 的总的亮度峰值,$p_i = n_i/N$,是第 i 个 OTU 在所有克隆中的比值。

4) 荧光定量 PCR 对 *cbbL*R 基因而言,定量 PCR 采用的引物对与 2)中的相同。用从 3.10×10^9 到 3.10×10^5 系列 10 倍稀释梯度的 5 次重复值画出标准曲线。从标准曲线上得到 *cbbL*R 基因的扩增效率为 98.5%,R^2 值为 0.985。对 *nifH* 基因而言,定量 PCR 采用的引物对与 2)中的相同。用从 1.34×10^9 到 1.34×10^5 系列 10 倍稀释梯度的 5 次重复值画出标准曲线。从标准曲线上得到 *nifH* 基因的扩增效率为 88.5%,R^2 值为 0.973。

1.3.3 土壤固氮酶活性的测定　土壤固氮酶活性的测定采用乙炔还原法[24]。主要步骤如下: 取相当于干重 20g 的新鲜土样置于 200 mL 用橡胶塞封口的广口瓶中,把瓶中 10% 空气用乙炔气进行置换,然后置于 28℃培养箱中在黑暗中保温 48 小时。瓶中乙烯的含量用安捷伦 1290 气相色谱仪测定,固氮酶活性用每小时每克干土生成的纳摩尔乙烯气体量表征 [C_2H_4 nmol/(g·h)]。

1.4 数据处理和分析

数据处理用 Excel 2003 软件。采用 SPSS 13.0 软件的非参数检验方法检验不同施肥处理下微生物特征的差异($P < 0.05$),相关性检验为 Spearman 相关($P < 0.05$)。用多属性决策法归一化处理各处理的土壤养分状态(对土壤有机碳、总氮和总磷养分进行无量纲表征)。首先把 4 种施肥处理下单个养分值分别进行归一化,公式为 $x_i' = x_i / \sum_{i=1}^{4} x_i$, 然后把每种施肥处理下归一化的 3 个养分值相加后取算术平均值,得到每种施肥处理归一化的养分值。

2 结果与分析

2.1 *cbbL*R 基因和 *nifH* 基因的 DGGE 图谱分析

从图 1 可以看出,*cbbL*R 基因和 *nifH* 基因在不同施肥处理下都具有多条清晰的条带,说明二者在所研究的土壤中均具有较高的多样性。图 2 显示,相同施肥处理下的 3 个重复之间能够很好地聚为一类,不同施肥处理 *cbbL*R 基因或 *nifH* 基因的 DGGE 图谱均能够清晰分开,说明不同施肥处理对 *cbbL*R 基因和 *nifH* 基因具有较好的选择作用。而且 CF 处理和 CFM 处理能够很好地聚为一类,这说明 *cbbL*R 基因和 *nifH* 基因在这两种施肥处理下的群落结构具有相对较高的相似性。

2.2 基于 DGGE 图谱的 *cbbL*R 基因和 *nifH* 基因多样性

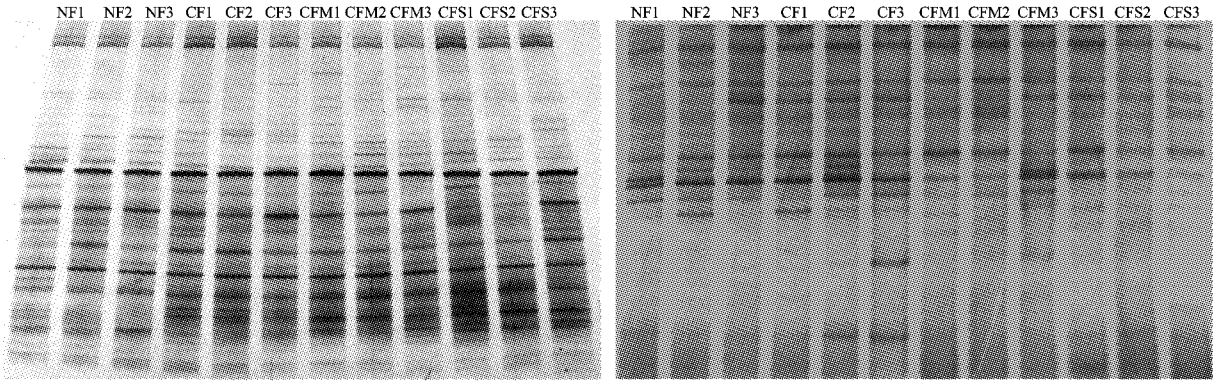

图1 *cbbL*R 基因(左)和 *nifH* 基因(右)的 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profile of *cbbL*R gene (left) and *nifH* gene (right)

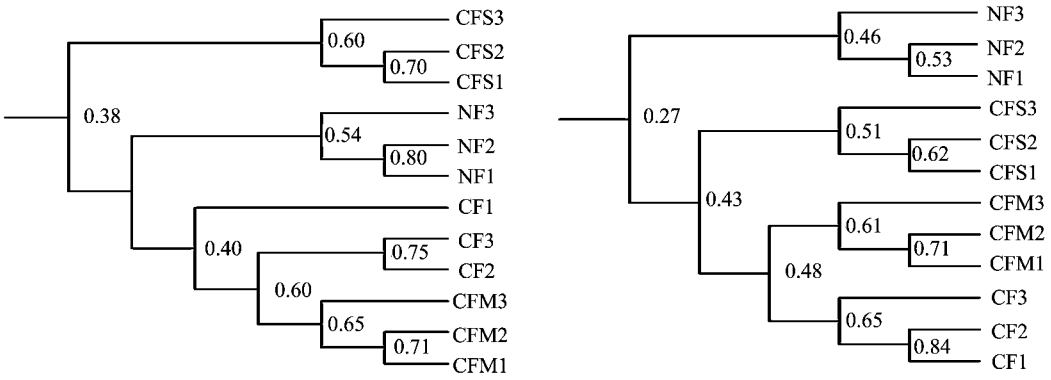

图2 *cbbL*R 基因(左)和 *nifH* 基因(右)DGGE 图谱的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of *cbbL*R genes (left) and *nifH* gene (right) based DGGE profiles

从表3可以看出,不同施肥处理下的 N_2 固定细菌和 CO_2 固定细菌群落多样性指数发生了明显的变化。总体而言,相对于 NF 处理,其它3种施肥处理均提高了 *cbbL*R 基因 Margalef 丰富度和香农-威纳多样性指数,但对均匀度没有影响。相对于 NF 处理和 CF 处理而言, CFM 处理和 CFS 处理降低了

表3 基于 DGGE 的 *cbbL*R 基因和 *nifH* 基因多样性

Table 3 Diversities of of *cbbL*R gene and *nifH* gene determined by DGGE profile

处理 Treatment	*cbbL*R			*nifH*		
	香农-威纳多样性指数 Shannon-Weaver diversity index	Margalef 丰富度 Margalef's richness	均匀度 Evenness	香农-威纳多样性指数 Shannon-Weaver diversity index	Margalef 丰富度 Margalef's richness	均匀度 Evenness
NF	3.32 ±0.04 c	2.61 ±0.07 b	2.27 ±0.01 a	3.54 ±0.09 a	2.87 ±0.02 a	2.31 ±0.06 a
CF	3.60 ±0.12 a	3.18 ±0.12 a	2.31 ±0.05 a	3.44 ±0.09 ab	2.74 ±0.12 a	2.27 ±0.03 a
CFM	3.51 ±0.00 ab	3.07 ±0.01 a	2.28 ±0.00 a	3.35 ±0.07 ab	2.50 ±0.05 b	2.27 ±0.05 a
CFS	3.43 ±0.11 bc	3.11 ±0.25 a	2.22 ±0.11 a	3.04 ±0.22 b	2.57 ±0.08 b	2.22 ±0.12 a

注(Note): 同列数据后不同字母表示处理间差异达5%显著水平 Values followed by different letters in a column are significant among treatment at the 5% level.

nifH 基因的 Margalef 丰富度和香农-威纳多样性指数,但施肥对均匀度没有显著影响。

2.3　基于定量 PCR 的 *cbbLR* 基因和 *nifH* 基因丰度

cbbLR 基因的拷贝数(copies)在 3 种施肥处理下均得到了提高(表 4),相对于 NF 处理的 1.41×10^7,CF、CFM 与 CFS 处理下 *cbbLR* 基因丰度分别为 7.97×10^7、27.17×10^7 和 12.07×10^7 copies/g,提高幅度分别为 465%、1827% 和 758%。对 *nifH* 基因而言,与 NF 处理下的 2.39×10^9 copies/g 相比,CF、CFM 和 CFS 处理下 *nifH* 基因丰度分别为 7.47×10^9、28.19×10^9 和 10.56×10^9 copies/g,提高幅度分别为 213%、1079% 和 344%。因此,施肥能显著提高 N_2 固定细菌和 CO_2 固定细菌的丰度。

表 4　基于定量 PCR 的 *cbbLR* 基因和 *nifH* 基因丰度

Table 4　Abundances of *cbbLR* and *nifH* gene determined by real-time PCR

基因 Gene	处理 Treatment			
	NF	CF	CFM	CFS
cbbLR($\times 10^7$ copies/g)	1.41 ±0.23 d	7.97 ±1.34 c	27.17 ±5.34 a	12.07 ±0.97 b
nifH($\times 10^9$ copies/g)	2.39 ±1.82 c	7.47 ±4.15 bc	28.19 ±12.99 a	10.56 ±3.80 ab

注(Note): 同列数据后不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a column are significant among treatment at the 5% level.

2.4　生固氮菌的数量

图 3 显示,相对于 NF 处理的 7.12×10^6 cfu/g,自生固氮菌的数量在 CF、CFM 和 CFS 处理下分别提高到了 1.12×10^7、1.18×10^7 和 1.47×10^7 cfu/g,提高幅度分别为 58%、66% 和 106%。因此,施肥能显著提高自生固氮菌的数量。

从图 4 可以看出,CF 处理和 CFM 处理下的土壤固氮酶活性分别为 7.79 和 7.58 C_2H_4 nmol/(g·h),显著高于 NF 和 CFS 处理的 2.56 和 2.24 C_2H_4 nmol/(g·h)。因此与 NF 处理相比,CF 和 CFM 处理能显著提高土壤 N_2 固定细菌的固氮活性,而 CFS 处理对土壤 N_2 固定细菌的固氮活性没有影响。

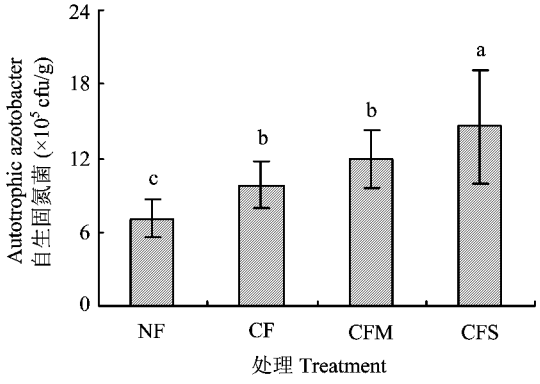

图 3　长期不同施肥下土壤中自生固氮菌数量

Fig. 3　CFUs of autotrophic azotobacter under different fertilization treatments

[注(Note): 柱上不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Different letters above the bars mean significant at 5% levels.]

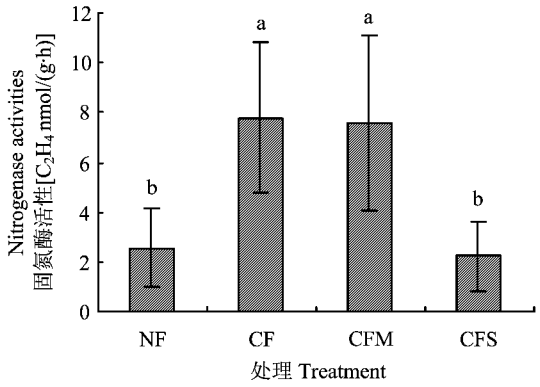

图 4　长期不同施肥下土壤固氮酶活性

Fig. 4　Soil nitrogenase activity under different fertilization treatments

[注(Note): 柱上不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Different letters above the bars mean significant at 5% levels.]

3　讨论

3.1　不同施肥措施对土壤 CO_2 固定细菌群落的影响

在本研究中,3 种施肥措施总体上提高了 CO_2 固定细菌的多样性,这与来自红壤稻田的长期施肥试验结果[14]一致。CF 处理直接或间接的为土壤 CO_2 固定细菌提供了较多可利用的能量物质(energy substrates),从而促进其生长。本研究也发现,在土壤有机碳含量较多的 CFM 与 CFS 处理下,*cbbLR* 基因丰度也相对较高,说明有机质与 CO_2 固

定细菌丰度之间具有某种内在的相互关系，而且 *cbbL*R 基因丰度与土壤归一化的养分呈极其显著正相关关系（$R^2 = 0.9960$，$P = 0.0020$）（图 5）。结合上述结论和 Selsi 等[11]的农田土壤微生物群落对 CO_2 的固定量最高可达呼吸排放量的 3%～5% 的结论，很可能说明 CO_2 固定细菌群落对土壤有机碳的同化量远远大于自身对土壤有机碳的贡献量。原因可能有以下几点，首先，一般而言，细菌对碳的需求是氮的 20 倍，而且有研究表明，即使在 C/N 比为 28 的土壤中，碳也是微生物生长的限制因子[25]。在本研究的长期施肥点，施肥已造成包括作物根茬碳与有机肥源碳在内的有机碳的总输入的显著增加[26]，并且有机碳组分也已经发生了改变[27]。因此，碳源“质”和“量”的改变是 CO_2 固定细菌变化的主要原因；其次，尽管 CO_2 固定细菌群落有固定 CO_2 的功能，但是由于其固碳条件的苛刻性[8]，使其在大田状态下高强度自发进行受到限制，因此可能处于不活跃状态；第三，尽管 *cbbL*R 基因在通常状态下并不活跃，但并非意味着这些基因毫无用处。相反，在 CO_2 固定细菌从外界获得碳源困难时，这些较高多样性的冗余基因，能够通过自身的代谢途径，从空气中获得额外的碳源进行补充，从而保持细菌自身功能的正常进行，维持土壤功能的稳定[28]。因此在本研究中，有机碳积累下因 *cbbL*R 基因的多样性和丰度提高而出现的功能基因冗余，意味着 CO_2 固定细菌对土壤中非生物环境的高度适应性是减少外界环境不利变化对其生存影响的保险对策[29]。

一般而言，微生物的功能发挥依赖于环境条件。

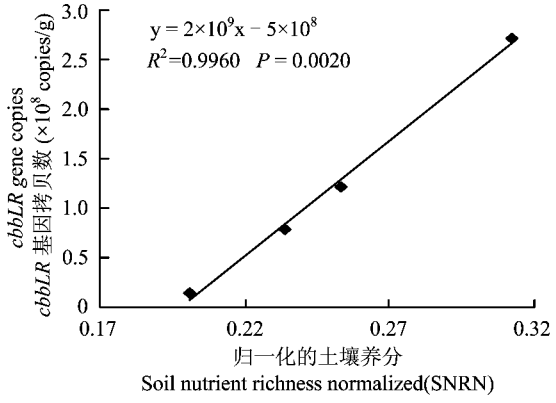

图 5 不同处理下 *cbbL*R 基因拷贝数（copies）与归一化的土壤养分量的关系

Fig. 5 The relationship between the SNRN and the copies of *cbbL*R gene

例如，在豆科植物的根瘤与高 H_2 浓度的小生境中，通过化能自养微生物固定的 CO_2 已经超过了呼吸作用[30]，这是豆科植物根际微生物通过自身代谢过程同时固氮与固碳的极佳例子。在本研究中，*cbbL*R 基因丰度和 *nifH* 基因丰度呈极其显著的正相关关系（$R^2 = 0.9883$，$P = 0.0058$），据此，我们猜测，这两大类微生物可能分别为对方提供碳源和氮源，从而促进了双方的生长，因而提高了其丰度，但这种猜测需要进一步的研究证明。

最近 Yuan 等[14]用提取土壤微生物总蛋白质并结合体外 CO_2 饱和保温的方法研究表明，CO_2 固定细菌丰度与固碳活性呈显著正相关，并因此提出施肥可促进 CO_2 固定细菌的生长并可能促进稻田土壤碳固定的假说。因此本研究的后续工作有必要对 *cbbL* 基因丰度与固碳活性之间的偶联关系进行验证。王竞等[31]通过优化 CO_2 固定细菌菌株的培养条件也显著提高了其固碳能力；在好氧培养条件下，改变电子供体也提高了海水及其沉积物富集样品中 CO_2 固定细菌群落的非光合固碳效率[32-33]；而且改变电子受体[34]也提高了地热泉中嗜热嗜酸微生物群落的固碳效率。因此在本研究的太湖地区水稻土中，明晰其中电子受体与电子供体的类型及其含量以及对固碳功能的影响意义重大。尤其要指出的是，室内培养试验结合同位素示踪技术的研究结果也证实，农田土壤微生物群落对 CO_2 的固定量最高可达呼吸排放量的 3%～5%[12]。另外添加有机质能够刺激兼性 CO_2 固定细菌的固碳活性[35]。此研究结果提示我们，尽管 CO_2 固定细菌群落对土壤有机碳的同化量可能较大，但稻田土壤 CO_2 固定细菌的固碳潜力以及对有机质积累的影响值得关注。由此可以看出，有机无机肥配施结合添加微量电子受体和电子供体可能是一个提高 CO_2 固定细菌固碳能力的较好选择。结合我们得出的在有机碳积累下降低微生物的 CO_2 释放势[36]并增强了甲烷氧化能力[18]的结论，可以做出有机碳积累具有更大的固碳能力与综合减排潜力的推断。然而目前的难度在于对自然状态下土壤 CO_2 固定细菌的固碳能力以及对土壤有机碳的贡献缺乏有效的检测手段，因此这个推断还有待于进一步证实。

3.2 不同施肥措施对土壤 N_2 固定细菌群落结构的影响

土壤有机碳水平能显著影响土壤微生物基因和功能多样性[25,37]，而固氮细菌对有机碳的需求和依赖性更高。在本研究中，平板菌落计数的结果表明，

自生固氮菌的数量与土壤有机碳和微生物生物量碳之间均呈显著正相关($R^2=0.9378, P=0.0319$; $R^2=0.9211, P=0.0401$),这说明长期施肥能提高土壤有机碳和活性有机碳水平,因而提高对微生物的承载力,自生固氮菌的数量也得以提高。这个结论与来自北京褐潮土的长期试验研究结果[38]相一致。

在本研究中,不同施肥处理下固氮菌的 DGGE 图谱(图 1 右)显示,大多数条带的迁移位置在不同施肥处理之间具有高度一致性,这种一致性反映了所研究土壤中 *nifH* 基因库的相对稳定性[21]。与 NF 处理相比,3 种施肥处理下的 *nifH* 基因多样性较低,其中 CFM 处理下的香农多样性指数较低,Margalef 丰富度指数也最低,这与 Teng 等[16]对江西红壤的高量有机肥下这两个多样指数较低的研究结果也是一致的,可能与有机肥对微生物物种的选择性有关。但是,3 种施肥处理下的 *nifH* 基因丰度均有较大幅度提高,统计分析表明,*nifH* 基因丰度与归一化的土壤养分呈显著正相关(图 6),因此,土壤总体养分状况的改善支持了更多的 N_2 固定细菌的生长,这与在江西红壤区旱地的长期试验研究结果[16]是相似的,即总有机碳、总氮、总磷和钾含量是影响红壤中固氮菌多样性的主要因子。另外,单施高量有机肥反而可能降低自生固氮菌的数量[38]和 *nifH* 基因多样性[16]; 也有报道指出,单施氮肥也降低了水稻根际 *nifH* 基因的丰度[39]; 而且高量氮肥也降低了高粱根际 *nifH* 基因的丰度[40]。因此平衡施肥对控制土壤 N_2 固定细菌群落多样性至关重要。结合自生固氮菌的数量与有机碳含量呈显著正相关关系的结论,我们提出,在本研究中,有机无机肥配施下的土壤养分平衡是 N_2 固定细菌群落较高丰度的关键因素,而有机碳含量是最为重要的因素。

结合 Pan 等[2]对水稻产量估算数据的分析表明,水稻产量与 *cbbL*R 和 *nifH* 基因丰度的变化趋势是一致的,而且 *cbbL*R 基因丰度与水稻产量呈显著正相关($R^2=0.9337, P=0.0337$)。综合土壤有机质积累提高总细菌群落[7]与甲烷氧化菌群落[18]的多样性和真/细菌比[19]的结论和本研究中提高自生固氮菌数量的结论,以及平衡土壤养分与 N_2 固定细菌和 CO_2 固定细菌丰度呈显著正相关的结论,我们提出,土壤有机质积累与养分平衡下微生物多样性与丰度得以提高,这是维持稻田土壤生态系统的稳定和加速土壤养分周转的关键原因所在,从而可能对水稻产量产生重要影响。

在本研究中,土壤固氮酶活性与土壤有机碳、其余土壤因子和水稻产量没有相关性,而且与固氮微生物的丰度和多样性之间也没有偶联性,因此土壤微生物的固氮酶活性并未随着有机碳的积累而提高。来自同位素分馏的证据表明,与吸收同化、硝化和反硝化过程中 N 同位素分馏相比,生物固氮过程中分馏效应很小[41],但是土壤固氮酶活性对水稻的产量有贡献[42],因此,土壤 N_2 固定细菌对土壤氮库的贡献值得关注。

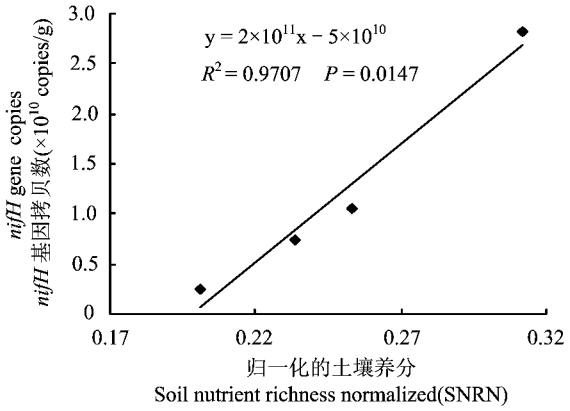

图 6　归一化的土壤养分与 *nifH* 基因拷贝数之间的关系

Fig. 6　The relationship between the SNRN and the copies of *nifH* gene

尽管固氮微生物的固氮机制比较复杂,但是在水稻生长后期,根际接种多个自生固氮菌菌株的组合能够表现出一定的促进作用[43]。另外,玉米根际接种自生固氮菌能显著提高土壤微生物的总代谢活性[44]; 而且我们也发现,在太湖地区水稻土中,有机无机肥长期配施能够促进土壤团聚体的聚合和提高较大团聚体中酶活性,因而具有提高土壤整体生物活性功能[45]。因此在本研究中,CF 处理提高了土壤有机碳含量,自生固氮菌数量、*nifH* 基因丰度与固氮酶活性也相应提高,这很可能是通过适应土壤高活性有机质、调控微生物之间的相互关系并加速养分周转的表现。然而,来自辽河平原潮棕壤旱地长期施肥试验有不同的报道,即土壤固氮活性与土壤有机碳和总氮含量均呈显著负相关关系[17],说明尽管土壤有机碳含量较高,但较高的土壤氮素水平反而抑制了固氮酶活性的发挥。这个结论也被 Tanak 等[46]水稻土微生态的短期培养实验结果所印证,即低 C/N 比和高氮含量的农家肥对土壤固氮微生物的固氮活性没有显著影响,而高 C/N 比的水稻秸秆刺激了土壤固氮微生物的固氮活性。在本研究中,尽管 CFS 处理中的秸秆可能刺激了土壤微生

物的固氮活性,但是较高的氮素含量对固氮酶的抑制作用高于秸秆的刺激作用,因而固氮酶活性反而降低;然而在较高有机碳水平的 CFM 处理下,尽管土壤氮素水平较高,对固氮活性具有抑制作用,但由于有较高的磷素水平仍然保持了较高的土壤固氮酶活性[47]。因此,在本研究中,仅就提高土壤微生物的固氮酶活性而言,CFM 处理与 CFS 处理可能具有减少氮肥施用量的空间与可能。

4 小结

在长期施肥条件下,太湖地区水稻土在有机无机肥配施处理中其有机碳的积累促进了自生固氮菌的生长。土壤 N_2 固定细菌和 CO_2 固定细菌的丰度与土壤归一化的养分呈显著正相关,可以作为养分平衡的灵敏指示。

参考文献:

[1] Pan G X, Li L Q, Wu L S, Zhang X H. Storage and sequestration potential of topsoil organic carbon in China's paddy soils[J]. Global Change Biol., 2004, 10(1):79-82.

[2] Pan G X, Zhou P, Li Z P *et al*. Combined inorganic/organic fertilization enhances N efficiency and increases rice productivity through organic carbon accumulation in a rice paddy from the Tai Lake region, China[J]. Agric. Ecosyst. Environ., 2009, 131(3-4): 274-280.

[3] Lal R. Soil C sequestration impacts on global climatic change and food security[J]. Science, 2004, 304(5677): 1623-1627.

[4] Andre F C, Chantal H, Keith H *et al*. Thirty-seven years of soil nitrogen and phosphorus fertility management shapes the structure and function of the soil microbial community in a Brown Chernozem [J]. Plant Soil, 2009, 315(1-2): 173-184.

[5] He J Z, Zheng Y, Chen C R *et al*. Microbial composition and diversity of an upland red soil under long-term fertilization treatments as revealed by culture-dependent and culture-independent approaches[J]. J. Soils Sediments, 2008, 8(5): 349-358.

[6] Shen J P, Zhang L M, Guo J F *et al*. Impact of long-term fertilization practices on the abundance and composition of soil bacterial communities in Northeast China[J]. Appl. Soil Ecol., 2010, 46(1): 119-124.

[7] 张平究, 李恋卿, 潘根兴, 张俊伟. 长期不同施肥下太湖地区黄泥土表土微生物碳氮量及基因多样性变化[J]. 生态学报, 2004, 24(12): 2818-2824.
Zhang P J, Li L Q, Pan G X, Zhang J W. Influence of long-term fertilizer management on top soil microbial biomass and genetic diversity of a paddy soil from the Tai Lake region, China[J]. Acta Ecol. Sin., 2004, 24(12): 2818-2824.

[8] Saini R, Kapoor R, Kumar R *et al*. CO_2 utilizing microbes—A comprehensive review[J]. Biotechnol. Adv., 2011, 29(6): 949-960.

[9] Videmšek U, Hagn A, Schadolc M *et al*. Abundance and diversity of CO_2-fixing bacteria in grassland soils close to natural carbon dioxide springs[J]. FEMS Microbial. Ecol., 2009, 58(1): 1-9.

[10] Miltner A, Richnow H H, Kopinke F D, Kästner M. Assimilation of CO_2 by soil microorganisms and transformation into soil organic matter[J]. Org. Geochem., 2004, 35(9): 1015-1024.

[11] Selesi D, Schmid M, Hartmann A. Diversity of green-like and red-like ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes (*cbbL*) in differently managed agricultural soils [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71(1): 175-184.

[12] Miltner A, Kopinke F D, Kindler R *et al*. Non-phototrophic CO_2 fixation by soil microorganisms[J]. Plant Soil, 2005, 269(1-2): 193-203.

[13] Tolli J, King G M. Diversity and structure of bacterial chemolithotrophic communities in pine forest and agroecosystem soils[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71(12): 8411-8418.

[14] Yuan H Z, Ge T D, Wu X H *et al*. Long-term field fertilization alters the diversity of autotrophic bacteria based on the ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) large-subunit genes in paddy soil[J]. Appl. Microbiol. Biot., 2011, DOI: 10.1007/s00253-011-3760-y.

[15] 王英, 王爽, 李伟群, 等. 长期定位施肥对土壤生理转化菌群的影响[J]. 生态环境, 2008, 17(6): 2418-2420.
Wang Y, Wang S, Li W Q *et al*. Effects of long-term located fertilization on soil physiology transformation bacterium [J]. Ecol. Environ., 2008, 17(6): 2418-2420.

[16] Teng Q H, Sun B, Fu X R *et al*. Analysis of *nifH* gene diversity in red soil amended woth manure in Jiangxi, South China[J]. J. Microbiol., 2009, 47(2): 135-141.

[17] 徐永刚, 宇万太, 马强, 周桦. 不同施肥制度下潮棕壤氮素功能群活性的研究[J]. 水土保持学报, 2010, 24(3): 160-169.
Xu Y G, Yu W T, Ma Q, Zhou H. Effect of different fertilizations on activity of nitrogen functional group in aquic brown soil[J]. J. Soil Water Conserv., 2010, 24(3): 160-169.

[18] 郑聚锋, 张平究, 潘根兴, 等. 长期不同施肥下水稻土甲烷氧化能力及甲烷氧化菌多样性的变化[J]. 生态学报, 2008, 28(10): 4864-4872.
Zheng J F, Zhang P J, Pan G X *et al*. Effect of long-term different fertilization on methane oxidation potential and diversity of methanotrophs of paddy soil[J]. Acta Ecol. Sin., 2008, 28(10): 4864-4872.

[19] Liu D W, Liu X Y, Li L Q *et al*. SOC accumulation in paddy soils under long-term agro-ecosystem experiments from South China. VI. Changes in microbial community structure and respiratory activity [J]. Biogeosci. Discuss, 2011, 8(1): 1529-1554.

[20] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 2008. 97-99.
Li Z G, Luo Y M, Teng Y. Method of soil and environmental microorganisms[M]. Beijing: Science Press, 2008. 97-99.

[21] Poly F, Monrozier L J, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil[J]. Res. Microbiol., 2001, 152(1): 95-103.

[22] Muyzer G, Dewaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1993, 59(3): 695-700.

[23] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, Moffett B F. Using ecological diversity measures with bacterial communities[J]. FEMS Microbiol. Ecol., 2003, 43(1): 1-11.

[24] Zheng J Q, Han S J, Ren F R *et al*. Effects of long-term elevated CO_2 on N_2-fixing, denitrifying and nitrifying enzyme activities in forest soils under *Pinus sylvestriformis* in Changbai Mountain[J]. J. Forest. Res., 2008, 19(4): 283-287.

[25] Demoling F, Figueroa D, Bååth E. Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils[J]. Soil Biol. Biochem., 2007, 39(10): 2485-2495.

[26] 潘根兴, 周萍, 张旭辉, 等. 不同施肥对水稻土作物碳同化与土壤碳固定的影响—以太湖地区黄泥土肥料长期试验为例[J]. 生态学报, 2006, 26(11): 3704-3710.
Pan G X, Zhou P, Zhang X H *et al*. Effect of different fertilization practices on crop carbon assimilation and soil carbon sequestration: A case of a paddy under a long-term fertilization trial from the Tai Lake region, China[J]. Acta Ecol. Sin., 2006, 26(11): 3704-3710.

[27] Zhou P, Pan G X, Spaccini R *et al*. Molecular changes in particulate organic matter(POM) in a typical Chinese paddy soil under different long-term fertilizer treatments[J]. Eur. J. Soil Sci., 2010, 61(2): 231-242.

[28] Wohl D, Arora S, Gladstone J R. Functional redundancy supports biodiversity and ecosystem function in a closed and constant environment[J]. Ecology, 2004, 85(6): 1534-1540.

[29] 蔡昆争,段舜山.基因的功能冗余[J].生态学杂志, 2001, 20(4): 61-64.
Cai K Z, Duan S S. Functional redundancy of gene[J]. Chin. J. Ecol., 2001, 20(4): 6-64.

[30] Dong Z, Layzell D B. H_2 oxidation, O_2 uptake and CO_2 fixation in hydrogen treated soils[J]. Plant Soil, 2001, 229(1): 1-12.

[31] 王竞, 周集体, 张晶晶, 等. 固定 CO_2 氢细菌的筛选及其培养条件优化[J]. 应用与环境微生物学报, 2000, 6(3): 267-270.
Wang J, Zhou J T, Zhang J J *et al*. Screening and culture conditions of hydrogen-oxidizing bacteria[J]. Chin. J. Appl. Environ. Biol., 2000, 6(3): 267-270.

[32] 武满满, 孙佩哲, 胡佳俊, 等. 混合电子供体对好氧非光合微生物菌群固碳效率影响的析因实验分析[J]. 环境科学学报, 2011: 31(6): 1220-1226.
Wu M M, Sun P Z, Hu J J *et al*. Effect evaluation of different electron donors on CO_2 fixation by a non-photosynthetic microbial community under aerobic conditions using factorial design[J]. Acta Sci. Circumst., 2011, 31(6): 1220-1226.

[33] Hu J J, Wang L, Zhang S P *et al*. Optimization anaerobic of electron donors to improve CO_2 fixation efficiency by a non-photosynthetic microbial community under aerobic condition using statistical experimental design[J]. Biores. Technol., 2010, 101(18): 7062-7067.

[34] Boyd E S, Leavitt W D, Geesey G G. CO_2 uptake and fixation by a thermoacidophilic microbial community attached to precipitated sulfur in a geothermal spring[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2009, 75(13): 4289-4296.

[35] Murphy B A, Grundy F J, Henkin T M. Prediction of gene function in methylthioadenosine recycling from regulatory signals[J]. J. Bacteriol., 2002, 184(8): 2314-2318.

[36] Zheng J F, Zhang X H, Li L Q *et al*. Effect of long-term fertilization on C mineralization and production of CH_4 and CO_2 under anaerobic incubation from bulk samples and particle size fractions of a typical paddy soil[J]. Agric. Ecosyst. Environ., 2007, 120(2-4): 129-138.

[37] Dick R P. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters[J]. Agric. Ecosyst. Environ., 1992, 40(1-4): 25-36.

[38] 李秀英, 赵秉强, 李絮花, 等. 不同施肥制度对土壤微生物的影响及其与土壤肥力的关系[J]. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1591-1599.
Li X Y, Zhao B Q, Li X H *et al*. Effects of different fertilization systems on soil microbe and its relation to soil fertility[J]. Sci. Agric. Sin., 2005, 38(8): 1591-1599.

[39] Tan Z, Hurek T, Reinhold-Hurek B. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice[J]. Environ. Microbiol., 2003, 5(10): 1009-1015.

[40] Coelho M R R, Marriel I E, Jenkins S N *et al*. Molecular detection and quantifcation of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (Sorghum bicolor) sown with two levels of nitrogen fertilizer[J]. Appl. Soil Ecol., 2009, 42(1): 48-53.

[41] 李思亮, 刘丛强, 肖化云. 地表环境氮循环过程中微生物作用及同位素分馏研究综述[J]. 地质地球化学, 2002, 30(4): 40-45.
Li S L, Liu C Q, Xiao H Y. Microbial effect on nitrogen cycle and nitrogen isotope fraction on the earch' surface—A review[J]. Geol. Geochem., 2002, 30(4): 40-45.

[42] Yanni Y G, El-Fattah F K A. Towards integrated biofertilization management with free living and associative dinitrogen fixers for enhancing rice performance in the Nile Delta[J]. Symbiosis, 1999, 27(3-4): 319-331.

[43] Piao Z, Cui Z J, Yin B *et al*. Changes in acetylene reduction activities and effects of inoculated rhizosphere nitrogen-fixing

bacteria on rice[J]. Biol. Fert. Soils, 2005, 41(5): 371-378.

[44] 陈胜男, 谷洁, 付青霞, 等. 接种自生固氮菌对玉米根际土壤酶活性和细菌群落功能多样性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(2): 444-450.
Chen S N, Gu J, Fu Q X *et al*. Effects of inoculating azotobacter on soil enzyme activities and bacterial community functional diversity in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.)[J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 2012, 18(2): 444-450.

[45] 牛文静, 李恋卿, 潘根兴, 等. 太湖地区水稻土不同粒级团聚体中酶活性对长期施肥的响应[J]. 应用生态学报, 2009, 20(9): 2181-2186.
Niu W J, Li L Q, Pan G X *et al*. Responses of enzyme activities in different particle size aggregates of paddy soil in Taihu Lake region of China to long term fertilization[J]. Chin. J. Appl. Ecol., 2009, 20(9): 2181-2186.

[46] Tanaka H, Kyaw K M, Toyota K, Motobayashi T. Influence of application of rice straw, farmyard manure, and municipal biowastes on nitrogen fixation, soil microbial biomass N, and mineral N in a model paddy microcosm[J]. Biol. Fert. Soils, 2006, 42(6): 501-505.

[47] Liengen T. Environmental factors influencing the nitrogen fixation activity of free-living terrestrial cyanobacteria from a high arctic area, spitsbergen[J]. Can. J. Microbiol., 1999, 45(7): 573-581.