

DOI: 10.5846/stxb202008062048

马秀艳, 蒋磊, 宋艳宇, 孙丽, 宋长春, 侯爱新, 高晋丽, 杜宇. 温度和水分变化对冻土区泥炭地土壤氮循环功能基因丰度的影响. 生态学报, 2021, 41(17): 6707-6717.

Ma X Y, Jiang L, Song Y Y, Sun L, Song C C, Hou A X, Gao J L, Du Y. Effects of temperature and moisture changes on functional gene abundance of soil nitrogen cycle in permafrost peatland. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(17): 6707-6717.

温度和水分变化对冻土区泥炭地土壤氮循环功能基因丰度的影响

马秀艳¹, 蒋磊¹, 宋艳宇^{1,*}, 孙丽¹, 宋长春¹, 侯爱新², 高晋丽¹, 杜宇¹

1 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 湿地生态与环境重点实验室, 长春 130102

2 美国路易斯安那州立大学, 海岸与环境学院, 美国 LA 70803

摘要: 以大兴安岭多年冻土区泥炭地为研究对象, 通过室内模拟增温实验, 研究温度升高对不同深度(0—150 cm)土壤氮循环功能基因丰度的影响。同时针对 0—20 cm 和 20—40 cm 土壤设置两个水分处理, 分别为土壤原始含水量和淹水状态, 研究水分变化对表层土壤氮循环功能基因丰度的影响。结果表明温度升高显著提高了活动层(0—60 cm)、过渡层(60—80 cm)、永冻层(80—100 cm)中 *nifH*、*nirK* 基因丰度, 温度升高显著提高了活动层(0—40 cm)和过渡层(60—80 cm)中 *nirS* 基因丰度。温度升高显著提高了过渡层(60—80 cm) $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和较深永冻层(140—150 cm) $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的含量, 但降低了过渡层(60—80 cm) $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和较深永冻层(120—150 cm) $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的含量, 相关性分析表明, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量与 *nifH* 和 *nirS* 基因丰度呈显著正相关, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量与 *nirK* 基因丰度呈显著正相关, 说明温度升高能够通过改变微生物丰度促进过渡层固氮作用和反硝化作用。在增温条件下, 淹水处理使表层土壤 *nirS* 和 *nirK* 基因丰度及 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量降低, 但提高了 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量, 说明淹水造成了过度还原的条件使反硝化底物浓度降低, 降低反硝化微生物活性进而抑制了土壤反硝化作用。该结果对于明确未来气候变化影响下冻土区泥炭地土壤氮循环过程具有重要意义。

关键词: 温度; 水分; 氮循环; 土壤微生物功能基因; 泥炭地

Effects of temperature and moisture changes on functional gene abundance of soil nitrogen cycle in permafrost peatland

MA Xiuyan¹, JIANG Lei¹, SONG Yanyu^{1,*}, SUN Li¹, SONG Changchun¹, HOU Aixin², GAO Jinli¹, DU Yu¹

1 Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy Sciences, Changchun 130102, China

2 College of the Coast and Environment, Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70803, USA

Abstract: We sampled peatland soil columns in the Great Hing'an Mountains and studied the effect of temperature increasing on nitrogen cycle related functional gene abundance at different depths (0—150 cm) by indoor simulation incubation. We set up two moisture treatments, including soil original moisture content and flooding condition at 0—20 cm and 20—40 cm, to study the effect of moisture on nitrogen cycle related functional gene abundance in 0—20 cm and 20—40 cm. Temperature increasing significantly increased the abundance of *nifH*, *nirK* gene in active layer (0—60 cm), transition layer (60—80 cm) and permafrost layer (80—100 cm). Temperature increasing significantly increased the abundance of *nirS* gene in active layer (0—40 cm), and transition layer (60—80 cm). Temperature increasing increased the content of soil $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in transition layer (60—80 cm) and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ in permafrost layer (140—150 cm), while reduced

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41671105, 41620104005, 41871090, 41771102)

收稿日期: 2020-08-06; 网络出版日期: 2021-06-11

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: songyanyu@iga.ac.cn

the content of NO_3^- -N in transition layer(60—80 cm) and NH_4^+ -N in permafrost layer(120—150 cm). Correlation analysis showed that NH_4^+ -N had significantly positive correlation with *nifH* and *nirS* gene abundance, and NO_3^- -N had significant positive correlation with *nirK* gene abundance. These results indicated that temperature increasing promoted the nitrogen fixation and denitrification processes in transition layer(60—80 cm) by changing microbial abundance. Under the flooding condition, the abundance of *nirS* and *nirK* and the content of NH_4^+ -N in surface soil were decreased, while the content of NO_3^- -N in surface soil increased obviously. The concentration of denitrifying substrate was decreased by flooding, the denitrifying microbial activity was inhibited by flooding, and inhibited soil denitrification. The results are of great significance for clarifying the nitrogen cycle process under climate change in the future.

Key Words: temperature; moisture; nitrogen cycle; soil microbial functional gene; peatland

土壤微生物能够调节陆地生物地球化学循环,是土壤中重要的物质循环推动者,同时也是生物圈与非生物圈物质与能量交换的重要枢纽^[1]。它们在土壤有机质分解和元素循环中起着重要作用,土壤微生物通过微生物作用与周围环境发生交换,以此获得营养物质来满足自身需要^[2]。土壤微生物本身也是土壤养分库,对土壤养分的转化与供应起着重要作用^[3]。

固氮微生物种类丰富,其体内存在具有催化功能的固氮酶,其中 *nifH* 基因编码固氮酶中的铁蛋白^[4],是所有固氮微生物含有的最保守的功能基因,因此 *nifH* 基因被广泛应用于研究固氮微生物群落^[5]。反硝化作用是氮循环的关键步骤之一,反硝化是微生物参与土壤氮循环的重要过程之一。土壤中反硝化过程主要是由异养反硝化细菌完成^[6-7]。参与反硝化过程的酶主要有硝酸还原酶、亚硝酸还原酶、氧化氮还原酶和氧化亚氮还原酶,它们的编码基因分别为 *nar*、*nirK*/*nirS*、*norB* 和 *nosZ*,其中亚硝酸还原酶中的 *nirK* 和 *nirS* 分别为可溶性含铜酶和细胞色素酶的编码基因,是反硝化过程中研究最多也是最重要的功能基因^[8]。

土壤微生物对温度变化敏感,其对温度的响应直接影响生态系统过程^[9]。温度是控制生物反应的基础,不同生物体温度敏感性的变化可能会影响微生物对气候变化的响应^[10]。温度升高可以促进土壤微生物的呼吸作用,微生物消耗土壤中的氧气使土壤呈厌氧环境进而影响反硝化作用^[11]。有研究表明,温度变化对微生物量、微生物群落及其组成有直接影响^[12-13]。对草原生态系统土壤反硝化速率及其相关微生物变化的研究发现增温显著增加了高寒草原土壤中的反硝化细菌的数量及土壤反硝化速率^[14]。土壤水分含量是土壤氮素转化过程中至关重要的影响因素。土壤水分含量与其他土壤理化性质共同作用可显著改变土壤的孔隙度及孔隙分布,从而影响氧气在土壤中的流通,进而影响微生物的活性^[15-16]。短期的温度升高和水分增加可显著提高土壤 *nifH* 基因丰度^[17],不同水分条件下土壤中 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度随着水分的增加而增加^[18],*nirK* 基因对土壤水分变化的响应更灵敏^[19]。因此,研究温度和水分变化对氮循环功能基因丰度的影响对于明确未来气候变化影响下氮循环过程具有重要意义。

大兴安岭是我国唯一的地带性冻土分布区,也是世界上主要的泥炭分布区之一^[20],在全球变暖的影响下,中国东北的永久冻土区在过去的几十年里经历了显著退化^[21],永冻层不再是永久冻土而是转变成季节融化层,温度升高使得冻土融化,导致活动层呈淹水状态。前期研究表明温度升高会促进冻土泥炭地 N_2O 的释放,但其微生物机制尚不明确。本研究以大兴安岭冻土泥炭地为研究对象,通过室内模拟培养试验,采用实时定量 PCR 技术,研究土壤氮循环相关微生物对温度和水分变化的响应。本研究旨在为全球变暖影响下永久冻土区泥炭地氮循环变化提供基础数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究站点位于大兴安岭连续多年冻土区(东经 122°86',北纬 52°94'),属于寒温带季风性气候,全年无霜

85—110 d,11 月—次年 4 月冬季积雪,冻结期大概为 7 个月^[22]。年平均温度为−3.9℃。年平均降雨量为 350—550 mm,降水主要集中在 7—8 月^[23]。该地区主要植物类型包括常绿灌木、落叶灌木、草本植物,其中常绿灌木的主要代表为细叶杜香(*Ledum palustre*)和甸杜(*Chamaedaphne calyculata*),落叶灌木的主要代表为笃斯越橘(*Vaccinium uliginosum*),草本植物的主要代表为羊胡子草(*Eriophorum vaginatum*),而地被植物的主要代表为泥炭藓(*Sphagnum palustre*)^[24]。该地区的土壤类型为泥炭土。

1.2 样品采集与培养

2018 年 8 月,选取大兴安岭冻土区典型泥炭地,随机选取样地,采样地之间的距离至少为 10 m,每处用土钻采集 8 个土壤深度(0—20、20—40、40—60、60—80、80—100、100—120、120—140 cm 和 140—150 cm),其中 0—60 cm 深度为活动层,60—80 cm 深度为过渡层,80 cm 以下深度为永冻层。人工挑出植物根系、新鲜凋落物和石块等杂物,低温保存运回实验室。取一部分新鲜土壤样品测定土壤 pH 值和含水量,一部分土壤样品置于阴凉处风干后研磨,过 0.25 mm 筛,测定土壤样品的初始全氮含量。用于培养的土壤样品冷冻保存。

将土壤样品(相当于 20 g 干土重)置于 500 mL 广口瓶中,在 5℃ 和 15℃ 两个温度下培养,每个处理四次重复。针对 0—20 cm 和 20—40 cm 土壤,每一个温度设置两个水分处理,分别为采样时的土壤原始含水量和淹水状态,0—20 cm 和 20—40 cm 土壤含水量分别为 63.28%和 58.18%。淹水处理用去离子水调节淹水深度为 1 cm,广口瓶盖上密封硅橡胶塞子,开展为期 55 d 的培养试验。在实验结束后,分析测定土壤氮循环相关微生物功能基因 *nifH*、*nirK* 和 *nirS* 丰度以及 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量。

1.3 实验方法

1.3.1 土壤微生物功能基因丰度及温度敏感性

土壤微生物 DNA 提取^[25]:按照土壤 Fast DNA SPIN 快速提取试剂盒(MPbio,USA)说明书准确称取 0.3 g 土壤样品到 Lysing Matrix E 管中,加入 978 μL Sodium Phosphate Buffer 和 122 μL MT Buffer,采用 FastPrep[®] 处理后离心 14000 $\text{g}\times 10\text{ min}$,将上清液转移到一个新的 2 mL 离心管中,加入 250 μL PPS 离心 14000 $\text{g}\times 5\text{ min}$,将上清液转移到一个新的 5 mL 离心管并加入 1 mL Binding Matrix Suspension,用手颠倒 2 min 后静置 3 min,去除 500 μL 上清后转移混合液到 SPINTM Filter 后离心 14000 $\text{g}\times 1\text{ min}$,加入 500 μL SEWS-M 到 SPINTM Filter 中离心 14000 $\text{g}\times 1\text{ min}$,将 SPINTM Filter 下面 catch tube 中的液体倒掉,再离心 14000 $\text{g}\times 2\text{ min}$,将 SPINTM Filter 放到一个新的 Catch Tube 中室温下风干 5 min,加入 100 μL DES 离心 14000 $\text{g}\times 1\text{ min}$ 使 DNA 转移到 Catch Tube 中,−80℃ 冰箱保存。

提取后用 0.5%低熔点琼脂糖凝胶纯化 DNA 提取物,用苯酚-氯仿-丁醇萃取。为了获得更具代表性的 DNA 样本对每个样本进行 3 次重复处理。通过荧光定量 PCR 仪(7500,ABI,美国)定量测定细菌的 *nifH*、*nirK* 和 *nirS* 基因丰度^[26]。扩增所用引物及扩增程序见表 1,实时荧光定量 PCR 反应体系为 25 μL :12.5 μL 的 1 $\times$ SYBR 缓冲液(TaKaRa,Japan),0.4 μL 引物(10 μM),0.5 μL ROXII(TaKaRa),0.875 μL 3%BSA,0.625 μL 二甲亚砜(DMSO),10 ng DNA 模板。

表 1 土壤氮循环相关功能基因引物及扩增程序
Table 1 Primers and amplification procedures of soil nitrogen cycle functional gene

目标基因 Target genes	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	扩增程序 Amplification details	参考文献 References
<i>Bacterial-nifH</i>	PolF	TGCCAYCCSAARGCBGACTC	95℃ 10min, 40 cycles, 95℃ 15s, 60℃ 30s, 72℃ 30s, 80℃ 15s	[27]
	PolR	ATSGCCATCATYTCRCCGGA		
<i>Bacterial-nirK</i>	F1aCu	ATCATGGTCTGCGCGG	95℃ 10min, 6 touch down cycles: 95℃ 15s, 63℃ 30s (−1℃), 72℃ 30s; 95℃ 15s, 58℃ 30s, 72℃ 30s, 80℃ 30s, 35cycles	[28]
	R3Cu	GCCTCGATCAGRTTGTGTT		
<i>Bacterial-nirS</i>	cd3aF	GTSACGTSAGGARACSGG	95℃ 10min, 94℃ 1min, 57℃ 1min, 72℃ 1min, 83℃ 30s, 40 cycles	[29]
	R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA		

土壤微生物温度敏感性^[30]:

$$Q_{10} = \left(\frac{\text{Abundance}_2}{\text{Abundance}_1} \right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}}$$

式中, Abundance_1 代表较低温度 T_1 测定的微生物丰度, Abundance_2 代表较高温度 T_2 测定的微生物丰度。

1.3.2 土壤理化性质测定

土壤样品经硫酸湿法消解后, 利用 AA3 连续流动分析仪 (Seal Analytical 德国) 测定总氮含量^[31]。用 2 mol/L 的 KCl 溶液从土壤样品中提取无机氮, 过滤后用 AA3 连续流动分析仪 (Seal Analytical 德国) 测定滤液中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量。将一定量的鲜土置于 85℃ 烘箱恒温烘干至恒重, 根据烘干前重量及烘干后重量计算土壤样品含水量。用 PHSJ-3F 型酸度计测量水土比为 10:1 的水土混合液的 pH 值。

1.4 数据处理与分析

运用 SPSS 17.0 软件, 采用双因素方差分析 (two-way ANOVA) 和显著性差异 (Tukey) 以及 Pearson 相关分析等方法对不同土壤深度下土壤氮循环相关微生物功能基因丰度以及无机氮含量进行差异显著性分析, 检验温度和水分变化对土壤氮循环相关微生物数量的影响, 所有数据在进行方差分析前均进行正态性检验 (s-w 检验), 且符合正态分布, 并运用 Excel 2007 进行绘图。

2 结果

2.1 土壤初始理化性质

不同深度土壤初始理化性质如表 2 所示。土壤含水量范围为 57.49%—79.03%, 土壤 pH 值范围为 4.50—4.76, 土壤总氮含量变化范围为 4.48—11.53 mg/g。土壤含水量和总氮的最大值均出现在过渡层 (60—80 cm), 最小值均出现在冻土层 (140—150 cm)。该地区土壤偏酸性, 并且土壤酸性随土层深度的增加而减弱。

表 2 不同土壤深度初始理化性质

Table 2 Initial characteristics of different soil depths

土壤深度 Soil depth/cm	含水量 Moisture content/%	pH	总氮 Total N/(mg/g)
0—20	63.28±1.59ab	4.50±0.02a	10.22±0.58cd
20—40	58.18±2.15a	4.59±0.01ab	9.90±1.02cd
40—60	64.10±1.17ab	4.62±0.02bc	9.23±0.97cd
60—80	79.03±0.98c	4.67±0.02bcde	11.53±0.27d
80—100	68.14±4.12b	4.76±0.01e	8.33±1.06bc
100—120	68.97±1.39b	4.65±0.06bcd	6.30±0.37ab
120—140	69.17±2.32b	4.73±0.03cde	9.07±0.95cd
140—150	57.49±1.33a	4.74±0.05de	4.48±0.29a

同列不同字母表示土壤间差异显著 ($P < 0.05$)

2.2 温度升高对泥炭地土壤氮循环相关微生物的影响

2.2.1 温度升高对土壤氮循环相关微生物功能基因丰度的影响及其温度敏感性

培养 55 d 后, 土壤氮循环相关微生物功能基因丰度变化如图 1 所示: 0—20、20—40、40—60、60—80、80—100、100—120、120—140、140—150 cm 土层 *nifH*、*nirK*、*nirS* 功能基因丰度分别为 1.11×10^{10} — 1.08×10^{11} 、 2.60×10^6 — 6.87×10^8 、 9.07×10^7 — 2.18×10^9 基因拷贝数/g 干土。0—20、20—40、60—80、80—100 cm 土层中 *nifH* 基因丰度随着温度的升高显著增加, 140—150 cm 土层中 *nifH* 的基因丰度随着温度的升高显著降低, 温度升高显著提高了 0—20、20—40、40—60、60—80、80—100 和 140—150 cm 土层 *nirK* 基因丰度。0—20、20—40、60—80 cm 土层中 *nirS* 基因丰度随着温度的升高而显著增加, 但是 100—120、120—140、140—150 cm 土层中 *nirS* 基因丰度随着温度的升高而显著减少 (表 3)。双因素方差分析结果表明, 温度和土壤深度对 *nifH*、*nirK* 和 *nirS* 基因有显著影响, 并且存在交互作用 (表 4)。*nifH*、*nirK*、*nirS* 功能基因丰度的温度敏感性 (Q_{10}) 平均值

分别为 1.51、2.53、1.22。*nifH*、*nirK*、*nirS* 功能基因丰度的温度敏感性分别在 60—80、40—60、60—80 cm 土层最高,在 20—40、100—120、120—140 cm 土层最低(图 1)。

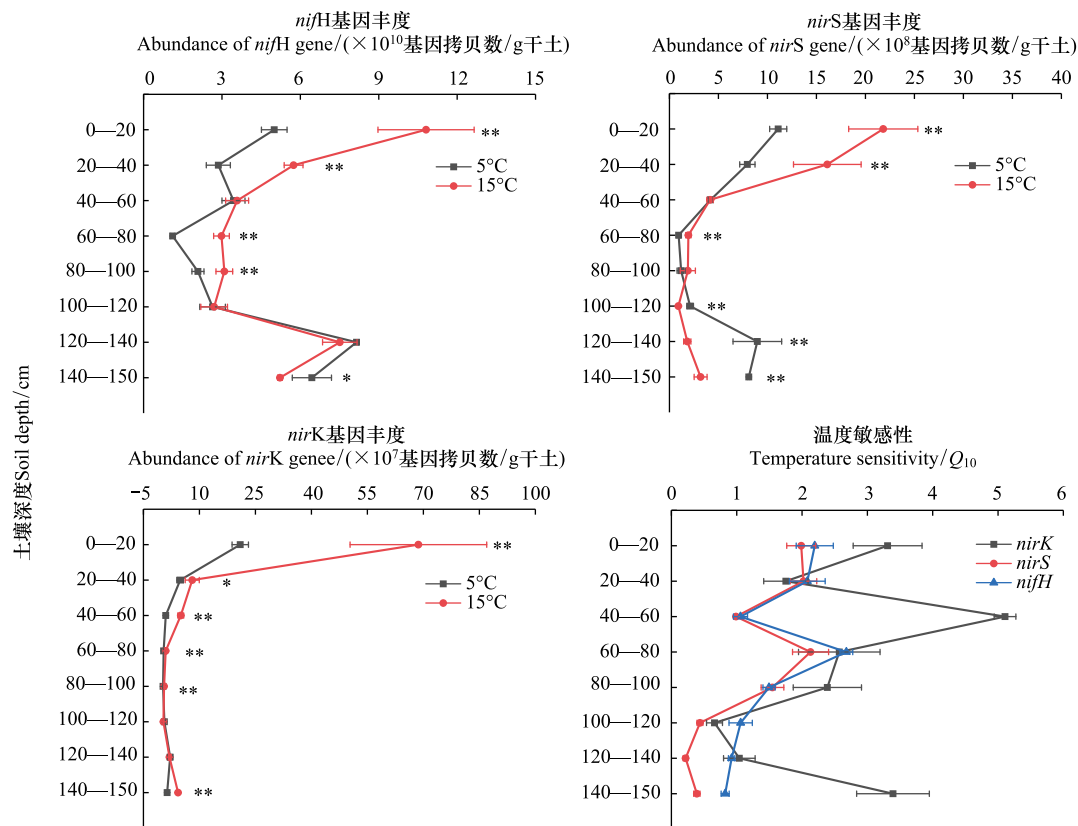


图 1 温度升高对不同深度土壤氮循环相关功能基因丰度的影响及其温度敏感性

Fig.1 Effect of temperature increasing on soil nitrogen cycle related functional gene abundance and its temperature sensitivity at different soil depths

表 3 温度对不同深度土壤氮循环相关功能基因丰度和有效氮含量影响的方差分析

Table 3 Result of variance analysis on the effects of temperature on soil nitrogen cycle functional gene abundance and available nitrogen contents at different soil depths

土壤深度 Soil depth/cm	<i>nifH</i>	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N
0—20	28.04 **	20.099 **	26.089 **	2.015	0.412
20—40	71.94 **	7.258 *	15.968 **	2.375	22.967 **
40—60	1.39	76.155 **	0.031	71.704 **	26.193 **
60—80	114.09 **	17.778 **	27.416 **	87.241 **	20.130 **
80—100	20.01 **	24.661 **	1.871	8.100 *	0.827
100—120	0.023	3.219	32.498 **	0.626	0.312
120—140	2.81	0.165	24.291 **	7.422 *	0.078
140—150	7.73 *	219.703 **	162.349 **	54.266 **	142.084 **

** 表示 $P<0.01$, * 表示 $P<0.05$

2.2.2 温度升高对土壤有效氮含量的影响及其与氮循环相关微生物的相关性

培养 55 d 后,土壤 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 含量变化如图 2 所示:0—20、20—40、40—60、60—80、80—100、100—120、120—140、140—150 cm 土壤 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 含量变化分别为 26.95—81.71 mg/kg 和 4.62—8.32 mg/kg。温度升高显著提高了 40—60、60—80 和 80—100cm 土层中 NH₄⁺-N 含量,但是显著降低了 120—140 和 140—150 cm 土层中 NH₄⁺-N 含量(图 2)。温度升高提高了过渡层土壤 NH₄⁺-N 含量,降低了较深永冻层(120—

150 cm) 土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量(表 3)。温度升高显著降低了 20—40、40—60 和 60—80 cm 土层中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量,显著提高了 140—150 cm 土层中的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量(图 2)。温度升高使过渡层土壤中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量降低,但是提高了较深永冻层(140—150 cm)土壤中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量(表 3)。双因素方差分析表明,温度和土壤深度对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量有显著影响,并且二者存在交互作用,土壤深度对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量有显著影响(表 4)。相关性分析表明: $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量与 *nifH* 和 *nirS* 基因丰度呈显著正相关, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量与 *nirK* 基因丰度呈显著正相关,*nifH* 与 *nirK* 和 *nirS* 呈显著正相关,*nirK* 与 *nirS* 呈显著正相关(表 5)。

表 4 温度和土壤深度及其交互作用对氮循环相关功能基因丰度和有效氮含量影响的双因素方差分析

Table 4 Two-way ANOVA on the effects of temperature and soil depth and their interaction on soil nitrogen cycle functional gene abundance and available nitrogen contents

影响因素 Influencing factors	<i>nifH</i>	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	$\text{NO}_3^-\text{-N}$
温度 Temperature	48.23 **	29.51 **	4.68 *	7.35 **	0.75
土壤深度 Soil depth	86.31 **	63.87 **	85.81 **	11.58 **	3.14 **
温度×土壤深度 Temperature×Soil depth	20.33 **	18.73 **	25.79 **	5.52 **	5.55 **

*** 表示 $P<0.01$, * 表示 $P<0.05$

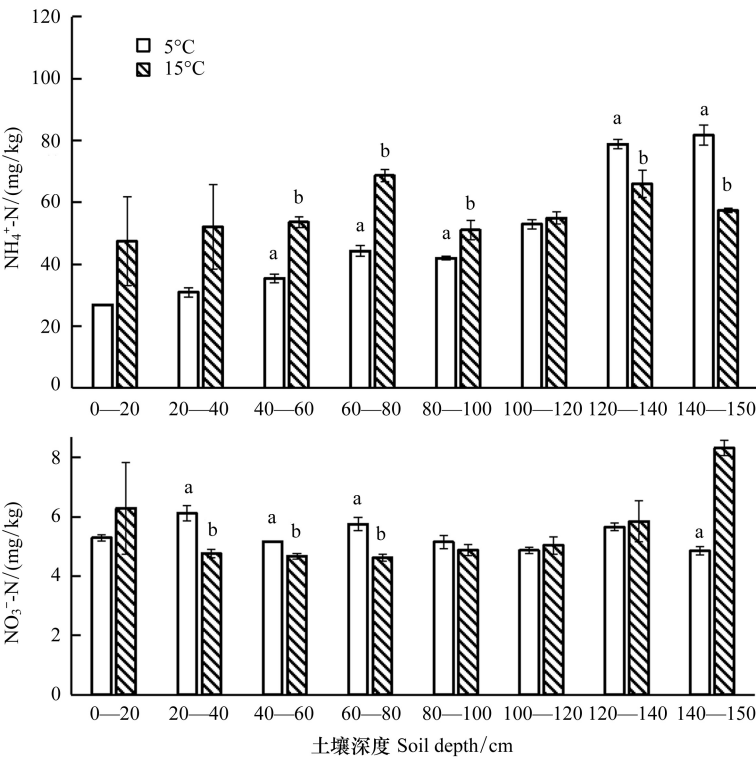


图 2 温度升高对不同深度土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量的影响

Fig.2 The effect of temperature increasing on $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ contents at different soil depths

表 5 氮循环相关功能基因与土壤氮含量相关分析

Table 5 Pearson correlation analysis of nitrogen cycle functional genes abundances and soil nitrogen contents

指标 Indicators	<i>nifH</i>	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	$\text{NO}_3^-\text{-N}$
<i>nifH</i>	1				
<i>nirK</i>	0.580 **	1			
<i>nirS</i>	0.688 **	0.727 **	1		
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	0.273 *	-0.125	0.409 **	1	
$\text{NO}_3^-\text{-N}$	0.193	0.264 *	0.194	0.036	1

*** 表示 $P<0.01$, * 表示 $P<0.05$

2.3 温度和水分变化对泥炭地表层土壤氮循环相关微生物的影响

2.3.1 泥炭地表层土壤氮循环相关微生物基因丰度变化

不同温度和水分条件下表层土壤固氮和反硝化细菌数量变化如图 3 所示:在 5℃ 和 15℃ 条件下,淹水处理使 20—40 cm 土壤 *nifH* 基因丰度增加了 104.19% 和 18.28%。0—20 cm 层 *nirS* 基因丰度分别降低了 37.21% 和 74.86%,*nirK* 基因丰度分别降低了 54.78% 和 57.06%。20—40 cm 土壤 *nirS* 基因丰度分别降低了 10.88% 和 67.02%,*nirK* 基因丰度分别降低了 50% 和 29.33%。在淹水条件下,温度升高使 0—20 和 20—40 cm 土壤中的 *nifH* 基因丰度分别增加了 18.68% 和 11.47%,*nirS* 基因丰度分别降低了 32.26% 和 25.94%,而 *nirK* 基因丰度分别增加了 212.17% 和 135.95%。水分及温度和水分的交互作用对 0—20、20—40 cm 层 *nirS* 和 *nirK* 及 20—40 cm 的 *nifH* 基因丰度有显著影响(表 6)。

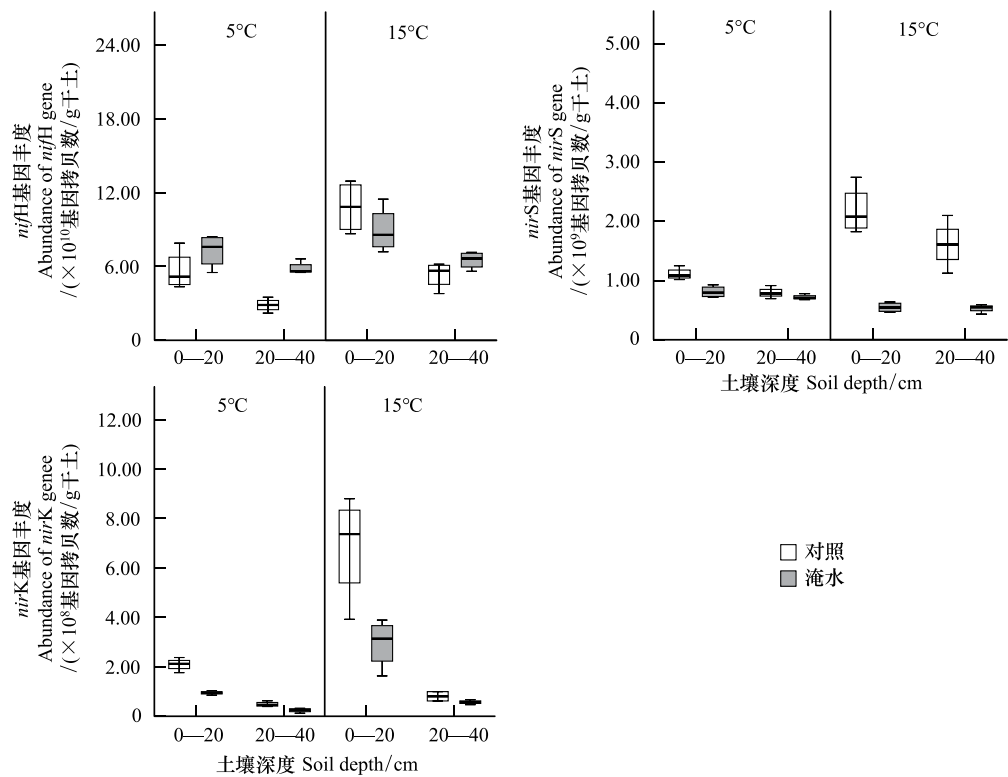


图 3 温度和水分变化对表层土壤氮循环关键功能基因丰度的影响

Fig.3 Effects of temperature and moisture on nitrogen cycle related functional gene abundance at topsoil

表 6 温度和水分对表层土壤氮循环功能基因丰度及氮含量影响的双因素方差分析

Table 6 Result of variance analysis of the effects of temperature and moisture on functional gene abundance and nitrogen contents at topsoil						
土壤深度 Soil depth/cm	影响因素 Influencing factors	<i>nifH</i>	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N
0—20	温度	15.21 **	33.40 **	13.64 **	23.30 **	9.20 *
	水分	0.02	18.68 **	77.92 **	169.40 **	494.82 **
	温度×水分	3.97	5.58 *	36.98 **	135.89 **	272.42 **
20—40	温度	17.60 **	23.72 **	9.15 *	231.48 **	7.03 *
	水分	31.34 **	12.81 **	30.83 **	1741.02 **	32.28 **
	温度×水分	5.75 **	0.01	23.17 **	1268.89 **	75.89 **

** 表示 $P<0.01$, * 表示 $P<0.05$

2.3.2 泥炭地表层土壤氮含量变化及其与氮循环相关微生物丰度的关系

不同温度和水分条件下表层土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量变化如图 4 所示:在 5℃ 和 15℃ 条件下,淹水处理使得 0—20 cm 和 20—40 cm 层土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量明显降低,而 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量明显增加。0—20 cm 土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量分别降低了 13.11%和 91.92%,而 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量增加了 13.31%和 130.77%。20—40 cm 土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量分别降低了 17.39%和 89.97%,而土壤 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量在 5℃ 条件下降低了 11.10%,在 15℃ 条件下增加了 67.86%。温度和水分及二者交互作用对 0—20 cm 和 20—40 cm 土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量有显著影响(表 6)。相关性分析如表 7 所示, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量与 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度呈显著正相关, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量与 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度呈显著负相关, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量呈显著负相关。*nifH* 与 *nirK* 和 *nirS* 呈显著正相关。

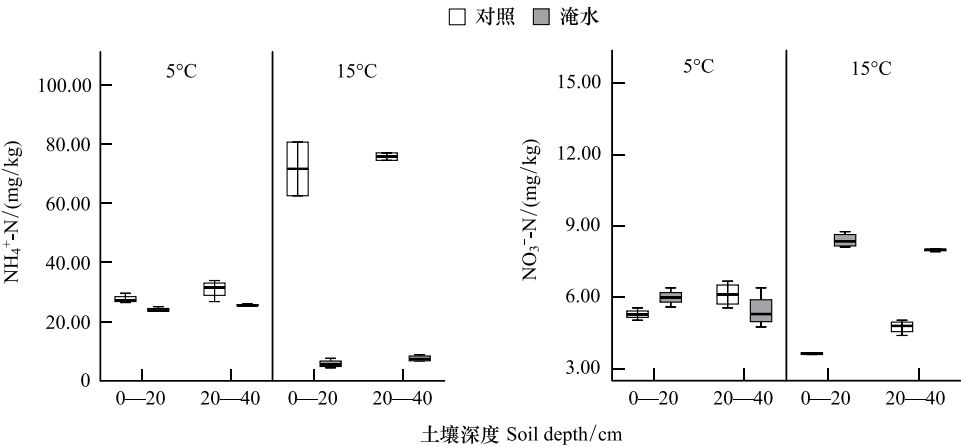


图 4 温度和水分对表层土壤氮含量的影响

Fig.4 Effects of temperature and moisture on nitrogen contents at topsoil

表 7 表层土壤氮循环相关功能基因丰度与土壤氮含量的相关分析

Table 7 Person correlation analysis of nitrogen cycle functional gene abundance and nitrogen contents at topsoil					
指标 Indicators	<i>nifH</i>	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	$\text{NO}_3^-\text{-N}$
<i>nifH</i>	1				
<i>nirK</i>	0.627 **	1			
<i>nirS</i>	0.631 **	0.655 **	1		
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	0.108	0.385 *	0.859 **	1	
$\text{NO}_3^-\text{-N}$	0.085	-0.374 *	-0.791 **	-0.834 **	1

* * 表示 $P<0.01$, * 表示 $P<0.05$

3 讨论

3.1 泥炭地不同深度土壤氮循环相关微生物及有效氮含量对温度变化的响应

3.1.1 泥炭地土壤氮循环微生物对温度升高的响应

nifH 是编码固氮酶的关键基因,是固氮菌中最保守的功能基因,*nirK* 和 *nirS* 是反硝化微生物重要的功能基因,是催化反硝化过程的关键^[8]。温度升高能够促进固氮菌的生长繁殖并使其数量增加^[32-33]。当温度控制在 20℃ 以下时,反硝化细菌丰度随温度的升高而增加,*nirK*、*nirS* 反硝化细菌活性变化与温度具有一定的相关性^[34]。本文研究结果与上述研究结果一致,温度升高导致冻土区泥炭地土壤固氮菌和反硝化细菌丰度增加,温度升高显著提高了活动层(0—40 cm)、过渡层、上部永冻层(80—100 cm)中 *nifH* 和 *nirK* 基因丰度,显著提高了活动层(0—40 cm)和过渡层中 *nirS* 基因丰度,说明温度升高能够促进土壤活动层(0—40 cm)、过渡层以及上部永冻层(80—100 cm)的固氮和反硝化过程。从图 1 可以看出 60—80 cm 深度土壤 *nifH* 和 *nirS* 基

因丰度的温度敏感性最高,说明温度升高对过渡层土壤固氮和反硝化作用影响更为强烈。而且,与 Jung 和 Wertz^[17,35]的研究结果类似,我们发现 *nirK* 基因丰度温度敏感性高于 *nirS* 基因丰度,说明 *nirK* 基因对温度变化的响应更灵敏。土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 是驱动土壤固氮细菌和反硝化细菌丰度变化的重要因子,相关分析结果表明 *nifH* 和 *nirS* 基因丰度与土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量呈显著正相关,*nirK* 基因丰度与土壤 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量呈显著正相关。此外,土壤有机碳、氮化合物等对微生物活性也有一定的影响^[36-37]。

3.1.2 泥炭地土壤有效氮含量对温度升高的响应

土壤有效氮受土壤水分、温度、微生物组成等各种因素的影响^[38]。在本研究中,温度升高显著提高了过渡层土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量和较深永冻层(140—150 cm)土壤 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量,但是显著降低了过渡层土壤 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量和较深永冻层(120—150 cm)土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量,说明温度升高增加了过渡层土壤氮有效性和较深永冻层(140—150 cm)土壤中硝氮有效性,降低了过渡层土壤中硝氮有效性和较深永冻层(120—150 cm)土壤氮有效性。温度升高不利于较深永冻层(120—150 cm)土壤氨化作用,同时,温度升高促进了过渡层土壤反硝化作用,*nirK*、*nirS* 反硝化细菌通过反硝化作用以 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为底物,消耗土壤中的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$,将 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 还原为 N_2O 、 N_2 或 NO ,这与过渡层 *nirK*、*nirS* 基因丰度变化一致。温度升高时,微生物生长代谢活动增强并大量分解有机物,提高了土壤氮的矿化速率,使土壤中氮含量显著增加^[39-40]。温度变化还可以通过影响土壤含水量进而改变土壤中氮的矿化速率^[41]。

3.2 温度和水分变化对泥炭地表层土壤氮循环相关微生物及有效氮含量的影响

3.2.1 泥炭地表层土壤氮循环相关微生物对温度和水分变化的响应

温度和水分能够影响土壤中细菌群落的多样性^[42],短期和长期的变化都可能改变土壤细菌的结构和组成^[43]。我们发现在增温条件下,淹水处理使表层土壤 *nirS* 和 *nirK* 基因丰度降低,可能是因为淹水造成了过度还原的条件,使反硝化底物浓度降低,反硝化微生物活性受到抑制,此研究结果与刘若萱在水田土壤中的研究结果一致,即淹水处理使反硝化微生物 *nirS* 和 *nirK* 基因丰度降低^[18]。温度和水分交互作用对表层土壤 *nirS* 和 *nirK* 基因丰度有显著影响,说明温度和水分对土壤氮循环 *nifH*、*nirK*、*nirS* 功能基因丰度的影响不是单方面的,而是二者交互作用的结果。温度和水分的变化会影响土壤微生物活性及其好氧厌氧状态,当土壤含水量发生变化时,会引起土壤孔隙度大小发生改变,微生物的活性及其利用有机物的能力受到影响。

3.2.2 泥炭地表层土壤有效氮含量对温度和水分变化的响应

温度升高影响微生物活性,水分变化影响土壤孔隙度的变化,间接影响微生物的好氧及厌氧过程,而 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 作为土壤中硝化和反硝化过程的底物直接参与土壤中氮素转化及 N_2O 的产生过程^[44]。温度和水分交互作用对表层土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量有显著影响。我们发现在增温条件下,淹水处理使表层土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量明显降低,而 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量呈明显增加的趋势,说明淹水环境不利于表层土壤氨化作用和反硝化作用,可能是因为温度升高,影响微生物活性,使氨化作用减弱,使 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 转化为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$,而水分过量会抑制反硝化作用,引起 NO_3^- 累积,这与淹水处理中表层土壤 *nirS* 和 *nirK* 基因丰度降低结果相对应,此研究结果与国秀丽^[45]的研究结果一致。

4 结论

本文主要研究了冻土区泥炭地土壤氮循环功能基因丰度对温度升高和水分变化的响应,研究结果表明:温度升高显著提高了泥炭地土壤活动层、过渡层以及上部永冻层(80—100 cm) *nifH*、*nirK*、*nirS* 功能基因丰度,进而促进上述土层的固氮和反硝化过程。温度升高显著提高了过渡层土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量和较深永冻层(140—150 cm)土壤 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量,但是显著降低了过渡层土壤中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量和较深永冻层(120—150 cm)土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量,进一步说明温度升高促进了过渡层土壤反硝化作用。在增温条件下,淹水处理使表层土壤反硝化细菌 *nirK*、*nirS* 功能基因丰度降低,同时提高了 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的含量,说明淹水处理抑制了泥炭地表层土壤反

硝化作用。本研究结果只是基于短期的室内培养实验,对于冻土区泥炭地土壤氮循环相关微生物过程对气候变化的长期响应模式仍需要开展长期的野外监测及模拟研究。

参考文献 (References):

- [1] 单文俊, 王庆贵, 闫国永, 邢亚娟. 基于土壤微生物的碳氮互作效应综述. 中国农学通报, 2016, 32(23): 65-71.
- [2] 仇少君, 彭佩钦, 荣湘民, 刘强, 唐麒. 淹水培养条件下土壤微生物生物量碳、氮和可溶性有机碳、氮的动态. 应用生态学报, 2006, 17(11): 2052-2058.
- [3] 李建宏, 李雪萍, 卢虎, 姚拓, 王理德, 郭春秀, 师尚礼. 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. 生态学报, 2017, 37(11): 3647-3654.
- [4] Zehr J P, Jenkins B D, Short S M, Steward G F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(7): 539-554.
- [5] 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.
- [6] Dendooven L, Anderson J M. Dynamics of reduction enzymes involved in the denitrification process in pasture soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26(11): 1501-1506.
- [7] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(4): 533-616.
- [8] 王海涛, 郑天凌, 杨小茹. 土壤反硝化的分子生态学研究进展及其影响因素. 农业环境科学学报, 2013, 32(10): 1915-1924.
- [9] Hayden H L, Mele P M, Bougoure D S, Allan C Y, Norng S, Piceno Y M, Brodie E L, DeSantis T Z, Andersen G L, Williams A L, Hovenden M J. Changes in the microbial community structure of bacteria, archaea and fungi in response to elevated CO₂ and warming in an Australian native grassland soil. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(12): 3081-3096.
- [10] Allison S D, Martiny J B H. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(S1): 11512-11519.
- [11] Schauffer G, Kitzler B, Schindlbacher A, Skiba U, Sutton M A, Zechmeister-Boltenstern S. Greenhouse gas emissions from European soils under different land use: effects of soil moisture and temperature. *European Journal of Soil Science*, 2010, 61(5): 683-696.
- [12] Frey S D, Drijber R, Smith H, Melillo J. Microbial biomass, functional capacity, and community structure after 12 years of soil warming. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(11): 2904-2907.
- [13] Castro H F, Classen A T, Austin E E, Norby R J, Schadt C W. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(4): 999-1007.
- [14] 德吉央宗. 藏北高寒草原土壤氮转化对短期增温的响应. 绿色科技, 2015, (5): 1-3.
- [15] Butterbach-Bahl K, Bagges E M, Dannenmann M, Kiese R, Zechmeister-Boltenstern S. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological sciences*, 2013, 368(1621): 20130122.
- [16] Cheng Y, Wang J, Wang S Q, Zhang J B, Cai Z C. Effects of soil moisture on gross N transformations and N₂O emission in acid subtropical forest soils. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, 50(7): 1099-1108.
- [17] Jung J, Yeom J, Kim J, Han J, Lim H S, Park H, Hyun S, Park W. Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils. *Research in Microbiology*, 2011, 162(10): 1018-1026.
- [18] 刘若萱, 贺纪正, 张丽梅. 稻田土壤不同水分条件下硝化/反硝化作用及其功能微生物的变化特征. 环境科学, 2014, 35(11): 4275-4283.
- [19] Szukics U, Hackl E, Zechmeister-Boltenstern S, Sessitsch A. Rapid and dissimilar response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to nitrogen and water amendment in two temperate forest soils. *Microbiological Research*, 2012, 167(2): 103-109.
- [20] 孙菊, 李秀珍, 王宪伟, 吕久俊, 李宗梅, 胡远满. 大兴安岭冻土湿地植物的生态特征及分布区型. 生态学杂志, 2010, 29(6): 1061-1067.
- [21] Jin H J, Yu Q H, Lü L Z, Guo D X, He R X, Yu S P, Sun G Y, Li Y W. Degradation of permafrost in the Xing'anling Mountains, northeastern China. *Permafrost and Periglacial Processes*, 2007, 18(3): 245-258.
- [22] 林尤伟, 蔡体久, 段亮亮. 大兴安岭北部兴安落叶松林雪水文特征. 北京林业大学学报, 2018, 40(6): 72-80.
- [23] Miao Y, Song C, Sun L, Wang X, Meng H, Mao R. Growing season methane emission from a boreal peatland in the continuous permafrost zone of Northeast China: effects of active layer depth and vegetation. *Biogeosciences*, 2012, 9(11): 4455-4464.
- [24] 蒋磊, 宋艳宇, 宋长春, 任久生, 王明全. 大兴安岭冻土区泥炭地土壤碳、氮含量和酶活性室内模拟研究. 湿地科学, 2018, 16(3): 294-302.
- [25] Wang H, Yang J P, Yang S H, Yang Z C, Lv Y M. Effect of a 10°C-elevated temperature under different water contents on the microbial

- community in a tea orchard soil. *European Journal of Soil Biology*, 2014, 62: 113-120.
- [26] Song Y Y, Song C C, Ren J S, Ma X Y, Tan W W, Wang X W, Gao J L, Hou A X. Short-term response of the soil microbial abundances and enzyme activities to experimental warming in a boreal peatland in Northeast China. *Sustainability*, 2019; 11(3): 590.
- [27] Fan L. Response of Diazotrophic Microbial Community to Nitrogen Input and Glyphosate Application in Soils Cropped to Soybean[D]. Auburn: Auburn University, 2013.
- [28] Hallin S, Lindgren P E. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4): 1652-1657.
- [29] Petersen D G, Blazewicz S J, Firestone M, Herman D J, Turetsky M, Waldrop M. Abundance of microbial genes associated with nitrogen cycling as indices of biogeochemical process rates across a vegetation gradient in Alaska. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(4): 993-1008.
- [30] Bai Z, Ma Q, Wu X, Zhang Y L, Yu W T. Temperature sensitivity of a PLFA-distinguishable microbial community differs between varying and constant temperature regimes. *Geoderma*, 2017, 308: 54-59.
- [31] Song Y Y, Song C C, Hou A X, Ren J S, Wang X W, Cui Q, Wang M Q. Effects of temperature and root additions on soil carbon and nitrogen mineralization in a predominantly permafrost peatland. *Catena*, 2018, 165: 381-389.
- [32] 钟熙敏. 岷江上游山地森林/干旱河谷交错带植被恢复对土壤固氮菌的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2011.
- [33] Supramaniam Y, Chong C W, Silvaraj S, Kit-PingTan I. Effect of short term variation in temperature and water content on the bacterial community in a tropical soil. *Applied Soil Ecology*, 2016, 107: 279-289.
- [34] Avrahami S, Liesack W, Conrad R. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(8): 691-705.
- [35] Wertz S, Goyer C, Zebarth B J, Burton D L, Tatti E, Chantigny M H, Filion M. Effects of temperatures near the freezing point on N_2O emissions, denitrification and on the abundance and structure of nitrifying and denitrifying soil communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83(1): 242-254.
- [36] Clark I M, Buchkina N, Jhurrea D, Goulding K W T, Hirsch P R. Impacts of nitrogen application rates on the activity and diversity of denitrifying bacteria in the Broadbalk Wheat Experiment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012, 367(1593): 1235-1244.
- [37] Penton C R, St. Louis D, Pham A, Cole J R, Wu L Y, Luo Y Q, Schuur E A G, Zhou J Z, Tiedje J M. Denitrifying and diazotrophic community responses to artificial warming in permafrost and tallgrass prairie soils. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 746.
- [38] Galloway J N, Aber J D, Erisman J W, Seitzinger S P, Howarth R W, Cowling E B, Cosby B J. The nitrogen cascade. *BioScience*, 2003, 53(4): 341-356.
- [39] Hester E R, Harpenslager S F, van Diggelen J M H, Lamers L L, Jetten M S M, Luke C, Lückner S, and Welte C U. Linking nitrogen load to the structure and function of wetland soil and rhizosphere microbial communities. *Msystems*, 2018, 3(1): e00214-17.
- [40] White-Monsant A C, Clark G J, Ng Kam Chuen M A G, Tang C. Experimental warming and antecedent fire alter leaf element composition and increase soil C: N ratio in sub-alpine open heathland. *Science of the Total Environment*, 2017, 595: 41-50.
- [41] 武丹丹, 井新, 林笠, 杨新宇, 张振华, 贺金生. 青藏高原高寒草甸土壤无机氮对增温和降水改变的响应. *北京大学学报: 自然科学版*, 2016, 52(5): 959-966.
- [42] Schimel J, Balser T C, Wallenstein M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, 2007, 88(6): 1386-1394.
- [43] Bond-Lamberty B, Bolton H, Fansler S, Heredia-Langner A, Liu C X, McCue L A, Smith J, Bailey V. Soil respiration and bacterial structure and function after 17 years of a reciprocal soil transplant experiment. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150599.
- [44] Haynes R J. Mineral Nitrogen in the Plant-soil System. Orlando: Academic Press, 1986.
- [45] 国秀丽. 温度和水分对土壤碳、氮转化影响的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2003.