

DOI: 10.20103/j.stxb.202406131371

吉毛加, 张首超, 王瑞红, 闫刚, 马振林, 杨维, 张新军. 藏东南高寒森林土壤固氮菌群落结构与固氮速率随海拔梯度的变化规律. 生态学报, 2025, 45(5): 2074-2083.

Ji M J, Zhang S C, Wang R H, Yan G, Ma Z L, Yang W, Zhang X J. Variation of soil nitrogen-fixing bacterial community structure and nitrogen fixation rate with altitude gradient in alpine forests in southeastern Xizang. Acta Ecologica Sinica, 2025, 45(5): 2074-2083.

藏东南高寒森林土壤固氮菌群落结构与固氮速率随海拔梯度的变化规律

吉毛加^{1,2,3,4}, 张首超^{1,2,3,4}, 王瑞红^{1,2,3,4}, 闫刚^{1,2,3,4}, 马振林^{1,2,3,4}, 杨维^{1,2,3,4}, 张新军^{1,2,3,4,*}

1 西藏农牧学院高原生态研究所, 林芝 860000

2 西藏高原森林生态教育部重点实验室, 林芝 860000

3 西藏林芝高山森林生态系统国家野外科学观测研究站, 林芝 860000

4 西藏自治区高寒植被生态安全重点实验室, 林芝 860000

摘要: 海拔在研究环境变化对土壤固氮菌群落结构与固氮速率的影响中具有独特优势。生物固氮是山地生态系统中生物可利用氮元素的重要来源。然而, 目前尚不清楚自生固氮菌群落特征和固氮速率与海拔梯度之间的关系。为了补这一认识上的不足, 在藏东南色季拉山沿海拔梯度(3700—4500 m)依次采样, 结合高通量测序技术分析固氮基因(*nifH*)的基础上, 确定色季拉山固氮菌多样性及其固氮速率沿海拔梯度的变化规律。研究结果表明, 色季拉山 3700—4500 m 海拔梯度范围内, 土壤固氮菌的 α -多样性随海拔梯度的增加而降低呈负相关($P < 0.05$); 固氮菌群落结构和土壤性质随海拔梯度发生了显著变化($P = 0.001$); 固氮速率受海拔高度的显著影响($P < 0.05$); 此外, 固氮菌群的 α 多样性主要受土壤中总碳和总氮含量的影响。结构方程模型分析结果表明海拔因子差异主要通过影响固氮菌多样性进而影响固氮速率。研究结果有助于丰富和提升西藏典型高山森林土壤固氮菌多样性和固氮通量对环境变化响应规律的认识。

关键词: 土壤生物固氮; 固氮菌; 海拔梯度; 高山森林; 西藏

Variation of soil nitrogen-fixing bacterial community structure and nitrogen fixation rate with altitude gradient in alpine forests in southeastern Xizang

Ji Maojia^{1,2,3,4}, ZHANG Shouchao^{1,2,3,4}, WANG Ruihong^{1,2,3,4}, YAN Gang^{1,2,3,4}, MA Zhenlin^{1,2,3,4}, YANG Wei^{1,2,3,4}, ZHANG Xinjun^{1,2,3,4,*}

1 Institute of Xizang Plateau Ecology, Xizang Agriculture and Animal Husbandry University, Linzhi 860000, China

2 Key Laboratory of Forest Ecology of Xizang Plateau, Ministry of Education, Linzhi 860000, China

3 National Forest Ecosystem Observation & Research Station of Linzhi XiZang, Linzhi 860000, China

4 Key Laboratory of Alpine Vegetation Ecological Security in Xizang, Linzhi 860000, China

Abstract: Altitude offers a unique vantage point for studying how environmental changes affect the community structure and nitrogen fixation rate of soil nitrogen-fixing bacteria. Biological nitrogen fixation is an important source of bioavailable nitrogen in mountain ecosystems. However, the relationship between the community characteristics and nitrogen fixation rate and the altitude gradient of autogenous nitrogen-fixing bacteria remains unclear. In order to make up for this lack of

基金项目: 西藏自治区科技计划项目(XZ202301YD0028C); 西藏自治区自然科学基金(XZ202301ZR0047G); 国家自然科学基金项目(31960013)

收稿日期: 2024-06-13; **网络出版日期:** 2024-12-04

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zxjun_126abc@126.com

understanding, this study determined the diversity of nitrogen-fixing bacteria and the variation of nitrogen fixation rate along the coastal uplift gradient of Sejila Mountain in southeast on the basis of sequential sampling (3700—4500 m) and analysis of nitrogen fixation genes (*nifH*) by high-throughput sequencing technology. The results showed that the α -diversity of soil nitrogen-fixing bacteria decreased with increasing altitude along the 3700 m to 4500 m gradient of Sejila Mountain ($P < 0.05$). The community structure and soil properties of nitrogen-fixing bacteria changed significantly with the altitude gradient ($P = 0.001$). The nitrogen fixation rate was significantly affected by altitude ($P < 0.05$). In addition, the α -diversity of nitrogen-fixing microbiota was mainly affected by the total carbon and total nitrogen content in the soil. The results of structural equation model analysis showed that the difference of altitude factor mainly affected the diversity of nitrogen-fixing bacteria, and then affected the nitrogen fixation rate. The results are helpful to enrich and improve the understanding of the diversity of soil nitrogen-fixing bacteria and the response of nitrogen-fixing flux to environmental changes in typical alpine forests in XiZang.

Key Words: soil biological nitrogen fixation; azotobacter; elevation gradient; alpine forests; Xizang

在生态环境中,如大多数温带、北方森林及高山冻原,氮元素(N)的有效性,即被植物的可利用性,是植物生长的第一限制性因素^[1-3]。有效氮是土壤等环境中能够被植物吸收利用的氮元素,主要有铵态氮、硝态氮、可利用的小分子有机氮,多数环境中往往缺乏满足植物生长所需要的足够的有效氮。

生物固氮(Biological nitrogen-fixing, BNF)是固氮菌将大气中的氮气(N_2)转化为植物可利用的氮(NH_3),生物固氮是自然生态系统中有效氮的最重要来源。特别是当环境中严重缺乏有效氮时,生物固氮对于生态系统的维持显得尤为重要^[4]。生物固氮可分为自生固氮、联合固氮和共生固氮,其中固氮菌与植物形成的共生固氮效率最高。但在一些生态系统中,每年通过自生固氮进入陆地生态系统中的氮元素可达 0—15 kg/hm²,可能占地球上所有陆地固氮量的一半左右^[5]。生物固氮可以缓解森林、草原、冻原、沙漠和海洋等生态系统对有效氮的需要,因此固氮菌群落在生态系统中的生态意义非常重要。环境因素影响着环境中微生物多样性及组成,如北方森林以及高海拔的北极-高山系统中微生物的群落结构和 α 多样性受到环境温度和湿度的影响。但是,在高山森林生态系统中自生固氮菌是如何对极端海拔变化进行响应的,仍是一个未知数。

高山森林环境是研究土壤微生物群落对气候和植被持续变化的响应,以及未来气候条件下的物种分布规律的良好平台^[6]。近年来,有大量关于高山生态系统中海拔变化对动植物生物多样性影响的研究^[7]。细菌丰度与系统发育多样性随着海拔的升高而逐渐降低^[8]。有研究表明土壤的 pH 值、养分、温度及降水量对固氮菌的群落结构产生影响^[9]。然而,在高山森林生态系统中生物因子及非生物因子如何影响土壤中的固氮菌群落结构仍然是一个研究空白。因此,揭示高山生态系统中海拔梯度如何影响固氮菌群落结构的潜在生态机制具有重要意义。在高山生态系统中海拔是诸多影响因子中最重要影响因子,海拔的变化会影响到温度、气压以及光照进而影响环境中生物群落的形成^[10]。由于全球范围内发现了各种与受海拔影响的生物多样性模型,海拔影响动植物空间结构的研究成为生态学和生物地理学研究中的核心问题。沿海拔梯度,可以在较短距离内会呈现出不同环境条件和生物群落的空间演替现象^[11]。尽管关于土壤细菌和土壤真菌的微生物群落受海拔变化影响的研究较多,但生物固氮及固氮菌区系对海拔变化的响应机制仍然不甚清楚^[12]。

色季拉山是位于喜马拉雅山脉东北部的典型的高山森林环境,具有完整的原始垂直山地生态系统,其中孕育了丰富的野生动植物资源。由于很少受到人为干扰,该地区的森林生态系统基本保持了原始自然状态。独特的地理、气候和植被条件使得色季拉山成为研究土壤中自生固氮菌垂直分布模型和通过固氮作用输入氮素养分的理想场所。有助于丰富和提升西藏典型高山森林土壤固氮菌多样性和固氮通量对环境变化响应规律的认识。本文按照海拔梯度(3700—4500 m)采样并结合高通量测序分析固氮基因,分析固氮菌多样性、群落组成及固氮潜力与海拔梯度的关系;明确色季拉山受海拔梯度影响的氮素输入潜力的主要驱动因子。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区域位于我国西藏东南部林芝市色季拉山(29°05′—29°62′N, 94°25′—94°59′E)。该区域年平均降水量(MAP)为1134 mm, 年平均气温(MAT)为-0.7℃^[13]。本研究区域沿海拔梯度具有典型的随温度呈现差异的生物类群分布特征, 在3700—4300 m之间为亚高山冷温带, 4300 m以上为高山寒带。3700—4300 m之间是以乔木冷杉等为主的垂直植被带, 4300 m以上为以杜鹃和方枝柏为主的灌丛植被带。

1.2 试验设计与土壤样品采集

土壤样本于2019年7月采自色季拉山四个海拔区域, 四个相邻地点之间海拔高度差间隔约200 m, 分别为3700—3900 m(A1)、3900—4100 m(A2)、4100—4300 m(A3)和4300—4500 m(A4)。每个海拔的采样点, 建立4个20 m×20 m的样地, 土样采样深度为0—20 cm, 每个样本随机采8个土样进行混合, 每个样地采4个混合土壤样本, 总共采集了16个混合样本(4个海拔4个地块)。从各个混合土样中取10 g土样装入自封袋放入盛有干冰的泡沫箱中冷藏, 用于分析其中的固氮菌群落组成及固氮速率。剩余土壤样品过2.0 mm土壤筛进行筛分, 并去除枯落物、植物根、碎石等, 处理后的土壤样品储存在4℃冰箱用于土壤性质分析。

1.3 土壤理化性质的测定

土壤理化性质测定参照邓米林等的方法^[14]。将土壤样品与蒸馏水按1:5(重量/体积)混合制备土壤悬液, 用pH计(FE20 FiveEasy™, Mettler Toledo, 德国)检测土壤pH值。称取10 g新鲜土样在105℃烘箱中烘至恒重, 称重后计算土壤样品的含水量。将风干的土壤样品过0.15 mm土壤筛, 利用CNS-2000分析仪(LECO, St. Joseph, MI, 美国)测定土壤中的总碳(TC)和总氮(TN)含量。用HF-HClO₄消解土壤样品后提取土壤中的总磷(TP)和总钾(TK), 并分别用钼蓝法和火焰分光光度法测定土壤中的总磷(TP)和总钾(TK)。用2M KCl溶液提取土壤(土壤:溶液=1:5)中的可溶性无机氮(NH₄⁺和NO₃⁻), 用自动分析仪III(SEAL Analytical, 德国)通过流动注射比色法测定样品中的无机氮。用高氯酸和50%硝酸将土样消化后, 用ICP-AES(Agilent 700, Agilent, Santa Clara, CA, 美国)测定钙(Ca)、铁(Fe)、锰(Mn)和锌(Zn)等元素在土壤中的含量。

1.4 固氮率测定

通过对固氮菌的培养实验来测定其对N₂的固定速率^[15]。取5 g新鲜土样加入到100 mL Pyrex试剂瓶中, 用O₂:N₂为1:4的人工混合气体充入瓶中。去除10%氧氮混合气体后用气密注射器吸取10¹⁵ N₂(99 atom% ¹⁵N; CAMPRO Scientific)注入瓶中, 使瓶内气压不变。同时设置平行处理组, 对照瓶中注入的是未标记的氮气。样品瓶在覆盖有中性密度筛选的培养箱中培养两周。从瓶子中收集土壤样品, 在60℃下恒温干燥, 然后包裹在锡杯(Heraeus CHN杯)中, 并用实验室压片机制成颗粒。利用元素分析仪(连续流动同位素质谱法)测定土壤样品中标记氮气的¹⁵N。潜在固氮率是根据土壤从¹⁵N₂中吸收的¹⁵N量与对照之间的差值进行计算的。由于本实验是在封闭环境(Pyrex试剂瓶)中进行。氧气氮气等气体无法与外界交换, 消耗完后无法继续补充、培养温度也是恒温而环境原位中的土壤温度受气温变化而变化等因素导致得到的潜在固氮率与环境原位实际的固氮率之间是有一定的差异性。但本文中得到的这种潜在固氮率仍然有助于评价土壤中固氮菌群落的固氮活性。

1.5 土壤DNA提取和nifH基因测序

利用编码固氮酶还原酶亚基的nifH(固氮基因)来评价自生固氮菌的固氮能力。根据土壤DNA提取试剂

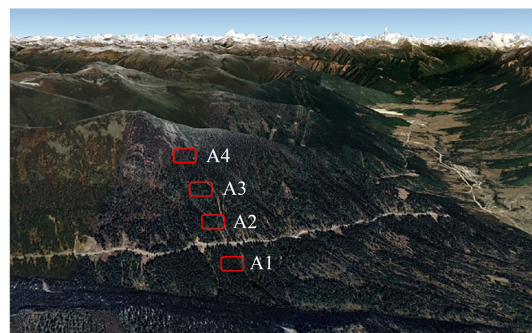


图1 西藏色季拉山地理分布图

Fig.1 Geographical distribution map of the Sejila Mountains in Xizang

A1: 3700—3900 m; A2: 3900—4100 m; A3: 4100—4300 m; A4: 4300—4500 m

盒 FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Bio-medicals, Solon) 方法所述,使用此试剂盒从 0.5 g 鲜土中提取固氮菌 DNA。用通用 PCR 引物 PolF (5'-TGCGYCCSAARGCBACTC-3') 和 PolR (5'-ATSGCCATY TCRCCGCGA-3') 扩增 *nifH* 基因,用 12 bp “标签” (barcode) 标记,其扩增片段长度约为 360 bp^[16]。25 PCR 反应体系由 12.5 Premix Ex Taq™ 2.0 版 (Takara Biotechnology)、1 正向引物 (10 μmol/L) 和 1 反向引物 (10 μmol/L)、DNA 模板 (10 ng) 和 8.5 μ 无菌 H₂O 组成。使用 Wizard SV 凝胶来回收 PCR 产物。纯化的 PCR 产物在 Illumina MiSeq PE250 平台上进行测序。

1.6 生物信息学和群落聚集分析

测序后,使用 QIIME (1.9.1 版) 处理原始读数。简言之,使用一种独特的“标签” (barcode) 标记引物为每个样本分配序列。检查序列质量,去除低质量序列 (质量值 < 20、含有模糊碱基、与引物或条码不适配的序列) 和嵌合体序列后。使用 dada2 去噪配对插件,将配对的末端正向/反向读长提交到四个过滤步骤。参数包括 (a) 修剪正向和反向读数,其中在 25 个碱基的截止点处去除引物和未定义的碱基 Ns。高通量测序数据被去噪,嵌合体被鉴定并从数据集中移除。通过在默认设置下使用 RDP 功能基因管线中的 FrameBot 工具来校正帧偏移 (身份截断 = 0.4; 长度截断 = 50)。对于分类分配,使用不同的方法对过滤后的合并读取进行对齐,并使用命令行 blastn 和 MEGAN 处理对 nt 数据库进行对齐。序列数据已存储在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中的 NCBI 序列读取档案 (SRA) 中,编号为 PRJNA687384。

1.7 数据处理

本研究使用 R 包中的 multcomp 函数进行方差分析,以评估土壤理化性质、土壤固氮速率、固氮菌 α 多样性指数以及固氮菌在类属水平上的相对丰度的差异。利用斯皮尔曼秩相关检验 (Spearman's test) 评价固氮菌 α 多样性与土壤环境参数之间的关系。使用专门用于群落生态学数据分析的 R 语言程序包 Vegan 包 (vegan package) R 3.5.3 对数据进行非度量多维标度 (NMDS)、Mantel 检验、PERMANOVA 检验 (adonis) 分析。采用偏最小二乘路径模型 (plspm),利用 R 包“plspm”中的“内图”函数,确定海拔、土壤因素对土壤固氮速率的直接和间接影响,其中土壤因素通过固氮菌 α 多样性和群落进行计算。根据拟合优度值,选择最佳模型。

2 结果与分析

2.1 土壤性质和固氮速率

土壤样品理化性质沿海拔梯度的变化如图 2 所示,从图中可以看出,不同海拔采样点的土壤样品的 TN、AN 和 TP 含量差异显著,而 TK、Ca、Fe、Mn、Zn 和 Mn 含量差异不显著 ($P < 0.05$; 图 2)。3700 m 和 3900 m 土壤样品的 TC、TN、AN 和 TP 含量显著高于 4100 m 和 4300 m ($P < 0.05$)。值得注意的是,不同海拔高度土壤样品的 pH 值没有显著差异。此外,受海拔高度的显著影响 ($P < 0.05$; 图 3)。海拔 3700 m 处的固氮速率显著高于海拔 4300 m 处,其次是海拔 3900 m 和 4100 m 处。在 3700 m 和 3900 m 之间,固氮速率没有统计学差异。

2.2 沿海拔梯度的固氮菌群落组成

将测定的所有序列样品,经过质控矫正 (Quality control correction)、嵌合体去除 (Chimerism removal) 和稀释分析处理 (Dilution analytical processing),从 2012930 个原始序列中总共保留了 1010871 个高质量序列。序列被聚类为 1678 个 ASV (Amplicon Sequence Variant)。在纲水平上,93.7% 的总序列被分类,包括 β 变形菌、δ 变形菌、α 变形菌和 γ 变形菌 (图 4)。方差分析表明,海拔高度不同,β-变形杆菌和 α-变形杆菌的相对丰度不同 ($P < 0.05$)。海拔 3700 m 处的 α-变形菌明显高于海拔 4300 m 处,而海拔 3700 m 处的 β-变形菌则明显低于海拔 4300 m 处。

在属水平上,共检测到 9 个主要属 (占总序列的 82.7%)。数量最多的属是伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia*)、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、草螺菌属 (*Herbaspirillum*)、地杆菌属 (*Geobacter*)、氮螺菌属 (*Azospirillum*)、弗兰克氏菌属 (*Frankia*)、需盐红螺菌属 (*Halorodospira*) 和甲基细胞菌属 (*Methylocella*) (图 4)。有四个属的丰度对海拔有显著性差异性。*Burkholderia* 的丰度随海拔的升高而增

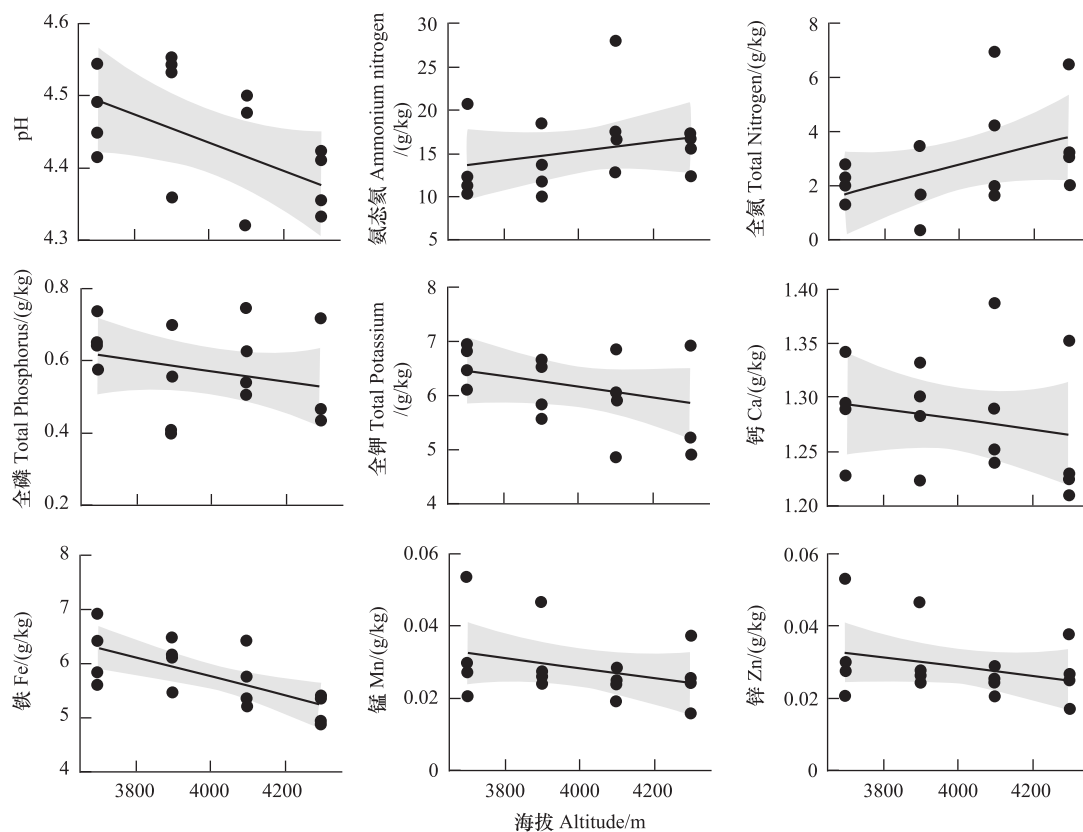


图2 沿海拔梯度的土壤性质变化

Fig.2 Changes in soil properties along the coastal uplift gradient

灰色阴影表示 95% 的置信区间

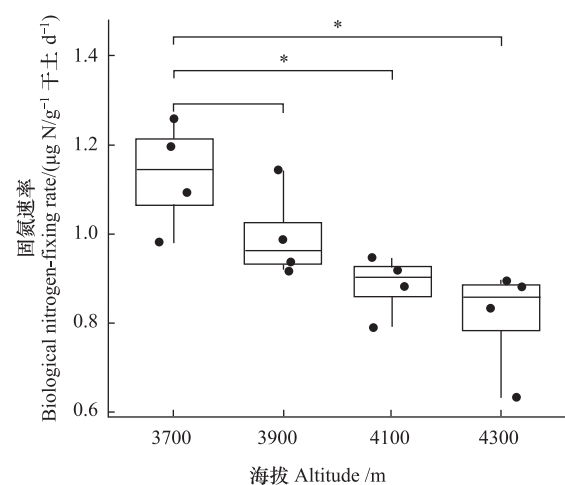
加, *Bradyrhizobium* 在 3700 m 处表现出高丰度, 而 *Geobacter* 和 *Azospirillum* 在 3900 m 或 4100 m 处通常表现出更高的丰度。

2.3 固氮菌多样性、群落组成以及与环境变量的联系

观察到的 OTU 中固氮菌的 α 多样性 ($P < 0.05$) 和 Shannon 指数 ($P < 0.05$) 沿海拔梯度显著降低。观测物种的 α 多样性和 Shannon 指数表现出相似的模式, 在 4300 m 的高海拔地区迅速下降 (图 5)。此外, 非度量多维尺度 (NMDS) 排序图显示, 固氮菌群落在不同海拔高度之间存在差异 (图 6)。置换多元方差分析 Multivariate Analysis of Variance, PERMANOVA) 表明, 固氮菌群落沿海拔梯度发生了显著变化 ($P = 0.001$)。固氮菌 α 多样性指数与海拔高度的增加呈负相关 ($P < 0.05$)。相反, 观察到固氮菌的物种与 TC、TN、TP、AN、Fe 和 Mn 含量呈正相关 ($P < 0.05$)。Shannon 指数与 TP、AN、Fe 和 Mn 含量呈正相关 ($P < 0.05$; 表 1)。

2.4 沿海拔梯度对 N_2 固定的直接和间接控制

沿着海拔梯度, 观察到的物种和 Shannon 指数与固氮速率呈正相关 ($P < 0.001$; 图 7)。通过曼特尔试验, 固氮群落的 Bray-Curtis 相异性与土壤固氮速率之间也存在显著的强正相关关系 ($P = 0.003$; 图 7)。为了进一

图3 沿海拔梯度的 N_2 固定率差异Fig.3 Difference in N_2 fixation of coastal uplift gradient* 表示基于 wilcox.test 的两个海拔高度之间的显著性差异 ($P < 0.05$)

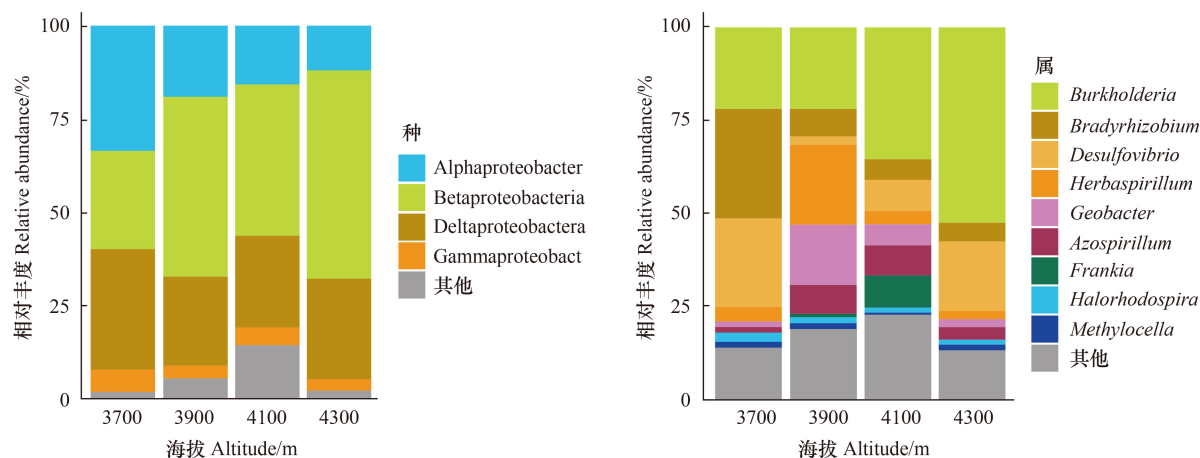
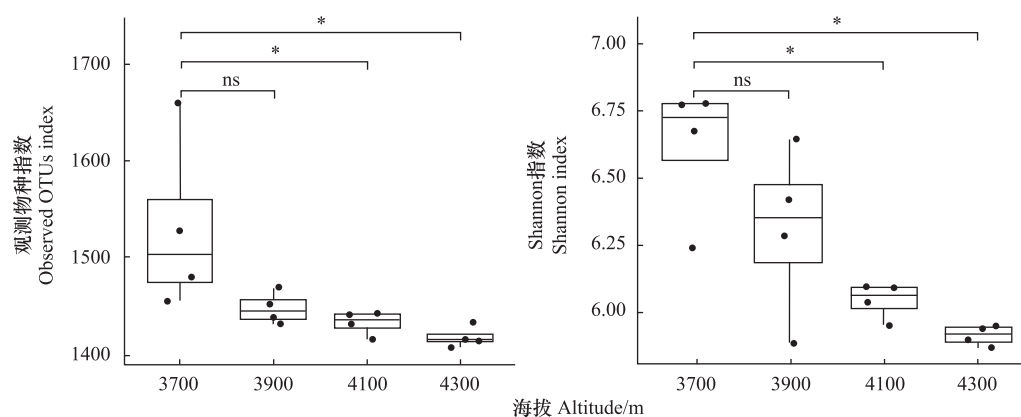


图 4 土壤固氮菌在纲水平和属水平上的相对丰度 (%) 随海拔梯度变化

Fig.4 The relative abundance (%) of soil nitrogen-fixing bacteria at the class level and

图 5 固氮菌群的 α 多样性和 Shannon 指数Fig.5 α diversity of nitrogen-fixing flora (Ah) and mountain farmer index (cloth)

α 多样性指数采用 wilcox.test 检验

步证明海拔高度对土壤固氮速率的直接和间接影响,进行了偏最小二乘路径建模(plspm, Partial least squares path modeling)分析。在保留了最佳模型后,plspm 分析完全解释了 76%的土壤固氮速率沿海拔梯度的变化(图 8)。plspm 分析表明,海拔高度主要通过直接影响固氮菌多样性间接影响土壤固氮速率(通径系数: -0.90)。此外,海拔高度对土壤性质(包括土壤 AN、TP、TK 和 Mn 含量;路径系数: -0.87)和固氮菌群落(路径系数: 0.69)有显著影响。然而,海拔高度并不能通过调节土壤性质和固氮菌群落来控制土壤固氮速率。

3 讨论

3.1 海拔高度驱动的固氮菌多样性和群落结构变化

在 3700 m 和 3900 m 的低海拔地区,固氮菌的多样性与高海拔地区的多样性大不相同,在 4100 m 以上的海拔地区,其多样性急剧下降。本文得到的固氮菌多样性模式与 Li 等所报道的高海拔区域的细菌多样性模式相似,细菌多样性从海拔 2600 m 以上时开始下降^[17]。对这种固氮菌多样性下降模式的一种可能解释是,海拔变化对温度、降水和土壤性质在内的非生物因素产生了显著影响^[18]。降水量和土壤有机碳、全氮随海拔升高而增加。土壤温度和 pH 值随海拔的升高而降低,土壤 C: 比下降^[19]。温度和湿度沿海拔梯度变化将促

进土壤微生物群落的变化,也会改变养分转化过程^[18]。固氮菌主要是异养微生物,其能量获取主要依赖于植物和土壤中提供的碳库、土壤有效磷含量和含水率等^[20]。因此,这些因素驱动的固氮菌群落也可能很重要。伯克霍尔德菌(*Burkholderia*)属于β-变形菌纲,其丰度随海拔高度增加而增加(图3)。这似乎与之前的研究相一致,伯克霍尔德菌已经广泛地描述了其固氮能力具有通过形成根瘤与植物共生的特征。它们通常存在于森林土壤中,具有在低温下生存和代谢的策略^[21-22]。温度、湿度相对适中、植物多样性较高的中低海拔地区通常保持较高的生物多样性^[23],如慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)和*Herbaspirillum*(草螺菌属,内生固氮菌)一般栖息在低海拔凉爽潮湿区域。本文研究结果表明,这些物种在高海拔土壤中的相对丰度较低(图3)。

土壤生态化学计量是评估土壤养分状况和质量的重要指标,也可作为C、N、P和K饱和度的参考标准,具有一定的生态学意义^[24]。本研究发现,对α-多样性影响最大的因素是土壤TC和TN(表1)。土壤TC或TN反映了土壤养分水平的状况,可以调节微生物养分利用效率并维持微生物元素稳态^[25]。土壤酸化通过加速原生矿物风化增强微量元素有效性,进而影响了土壤细菌多样性及其群落组成^[26]。先前基于农田体系的研究发现,施用有机肥增加了土壤C、N含量,进而提升固氮微生物多样性^[27];本研究在天然海拔梯度上得到类似结果,即土壤固氮微生物多样性与土壤TC和TN含量呈显著正相关。

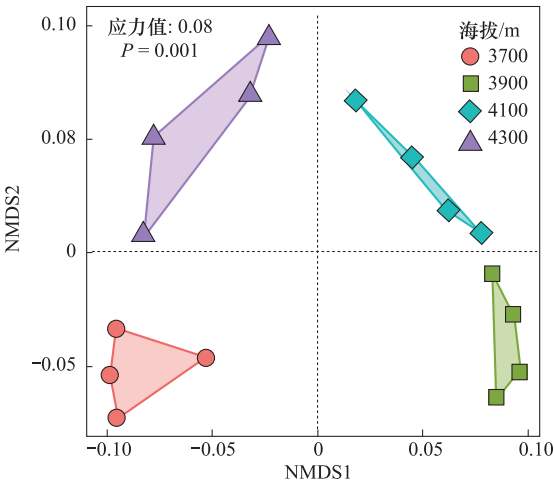


图6 Bray-Curtis 相异性沿海拔梯度绘制的样本之间的非度量多维定标(NMDS)排序图
Fig.6 Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) sequencing plot between samples plotted by Bray-Curtis heterogeneity coastal uplift gradient

表1 固氮菌群落分类和系统发育α-多样性指数与非生物变量的相关性

Table 1 The Correlation between diazotrophic community classification and phylogenetic α-diversity index and abiotic variables

	Shannon 指数		NTI 指数	
	R	P	R	P
海拔 Altitude	-0.674	0.006	-0.247	0.375
pH	0.904	0.000	0.729	0.002
氨态氮 AN	-0.518	0.048	-0.318	0.248
总碳 TC	-0.704	0.003	-0.718	0.003
总氮 TN	-0.718	0.003	-0.657	0.008
铁 Fe	0.700	0.004	0.696	0.004
锰 Mn	0.614	0.015	0.457	0.087
锌 Zn	0.557	0.031	0.596	0.019

NTI 表示净种间亲缘关系指数

有两种假说可以解释固氮菌在海拔梯度上的多样性模式。首先,自生固氮细菌可以通过直接影响营养物质的可利用性并有助于维持植物生产力和多样性来促进植物生长^[28]。其次,固氮菌的相互关联模型可能同时受到环境因素pH和总氮的影响^[29]。土壤pH、TC和TN与固氮营养多样性一致(表1)。固氮菌的α-多样性和β-多样性都受到海拔和pH的影响(图4和5)。在这项研究中,随海拔相关因子导致3700 m至4300 m的气候和植被类型的变化。这些影响因素可以通过促进具耐受性菌种的生长和限制适应能力较弱的微生物来调节固氮菌群落。在土壤变量中,土壤pH值被认为是沿海拔梯度驱动固氮菌群落结构的主要因素,因为

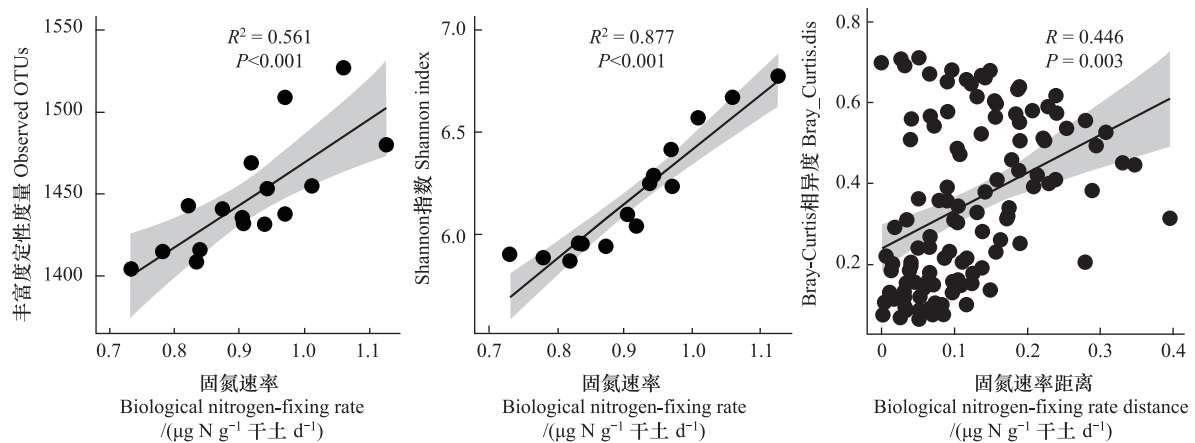


图7 物种和香农指数与BNF率的相关性

Fig.7 Correlation of species and Shannon index with BNF rate

灰色阴影表示95%的置信区间;BNF:生物固氮 Biological nitrogen-fixing

土壤 pH 值可以直接或间接地通过影响养分的可利用性来限制细菌生长^[29]。以往研究表明土壤 pH 是影响土壤固氮菌多样性和群落结构的重要因子^[30–31]。

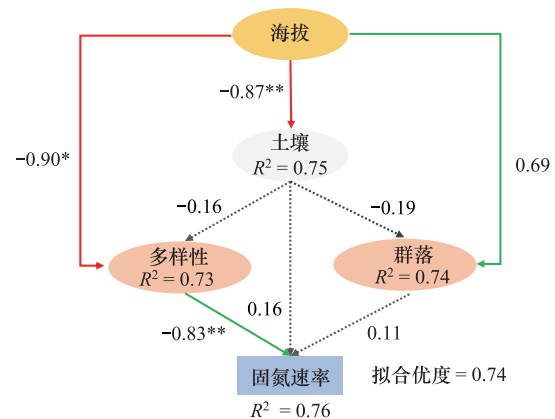
3.2 直接和间接多种因素控制土壤生物固氮速率

微生物 α 多样性指数是评价土壤微生物群落多样性的重要指标,多样性指数越高表明微生物群落丰富度和多样性越高,土壤生态环境越稳定^[32]。本文研究结果表明,色季拉山土壤固氮菌多样性沿海拔梯度升高明显降低,这与之前的研究结果不一致^[33]。这些结果表明,固氮菌分布可能遵循植物和动物沿海拔的分布模式。在本研究中,固氮菌群落的多样性和组成在不同海拔梯度之间存在很大的差异(图 5、6)。

本研究结果表明,固氮菌多样性及其群落组成主要受海拔高度的影响。除海拔 4300 m 以上的区域外,其余区域均以针叶树为主。在低海拔地区,人为干扰可能是另外一个不可避免的影响因素。人类干扰(如砍伐、道路建设等)可能会破坏土壤结构、降低土壤养分含量,进而影响土壤固氮微生物量与活性并影响环境中其他物种的生存状况,降低物种之间的连通性,并最终导致随机优势^[34–38]。此外,本研究结果表明,海拔高度主要通过影响固氮菌多样性进而影响土壤固氮速率。虽然海拔高度对土壤性质(包括土壤 AN、TP、TK 和 Mn 含量)和固氮菌群落有显著影响,但它们不能通过驱动土壤性质和固氮菌生态群落来控制土壤固氮速率。在高海拔地区,低温和稀薄的空气是制约其生物分布的主要环境因子,这将增加适应寒冷和缺氧栖息地的固氮菌种类(如极单胞菌, *Polaromonas*)的相对丰度。因此,固氮菌多样性的严酷环境选择模式可能是影响西藏典型高寒森林色季拉山土壤固氮速率的重要因素。

4 结论

在这项研究中,本研究将海拔梯度(3700—4500 m)采样与 *nifH* 基因的高通量测序相结合,确定了具有西

图8 海拔高度对N₂固定率的直接和间接影响Fig.8 Direct and indirect effects of altitude on N₂ fixation

有效的定向路径以绿色(正)和红色(负)直线箭头表示,线条粗细反映路径系数的相对强度;灰色虚线代表不显著的相关性。关键标准化路径系数标记在箭头旁, R^2 值涵盖所有重要内生变量;BNFR指BNF速率(biological nitrogen-fixing rate),多样性通过OTU观测值和Shannon指数衡量,而社区结构基于Bray-Curtis相异距离的非度量多维尺度排序;* :相关显著;** :相关极显著

藏典型高山森林生态系统特征的色季拉山海拔梯度固氮菌多样性分布模式。结果表明,色季拉山海拔 3700—4300 m 梯度范围内,固氮菌的 α -多样性随海拔高度的增加而降低,海拔高度对固氮菌群落结构和土壤性质产生了强烈的影响。综上所述,海拔梯度主要通过影响固氮菌多样性进而影响土壤固氮速率。因此,本研究为海拔如何通过介导沿海拔梯度的固氮菌多样性来驱动固氮速率输入提供了重要的见解。

参考文献 (References):

- [1] 褚海燕,王艳芬,时玉,吕晓涛,朱永官,韩兴国.土壤微生物生物地理学研究现状与发展态势.中国科学院院刊,2017,32(6):585-592.
- [2] Blaško R, Holm Bach L, Yarwood S A, Trumbore S E, Högberg P, Högberg M N. Shifts in soil microbial community structure, nitrogen cycling and the concomitant declining N availability in ageing primary boreal forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 91: 200-211.
- [3] 韩风毅,张贻荣,王思荣,杨智杰,郑勇,邓米林,贺纪正,林永新.亚热带典型杉木人工林根际土壤固氮菌丰度和群落结构.应用生态学报, 2024, 35(6): 1681-1688.
- [4] Penman T, Keith D, Elith J, et al. Interactive effects of climate change and fire on metapopulation viability of a forest-dependent frog in south-eastern Australia. *Biological Conservation*, 2015, 190: 142-153.
- [5] Reed S C, Cleveland C C, Townsend A R. Relationships among phosphorus, molybdenum and free-living nitrogen fixation in tropical rain forests: results from observational and experimental analyses. *Biogeochemistry*, 2013, 114(1): 135-147.
- [6] Wang Y S, Li C N, Kou Y P, Wang J J, Tu B, Li H, Li X Z, Wang C T, Yao M J. Soil pH is a major driver of soil diazotrophic community assembly in Qinghai-Tibet alpine meadows. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 115: 547-555.
- [7] Elsen R P, Tingley W M. Global mountain topography and the fate of montane species under climate change. *Nature Climate Change*, 2015, 5(8): 772-776.
- [8] Rowe J R, Heaney R L, Rickart A E. Scale effects on the pattern and predictors of small mammal diversity along a local elevational gradient in the Great Basin. *Journal of Biogeography*, 2015, 42(10): 1964-1974.
- [9] Bryant J A, Lamanna C, Morlon H, Kerkhoff A J, Enquist B J, Green J L. Colloquium paper: microbes on mountainsides: contrasting elevational patterns of bacterial and plant diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(Suppl 1): 11505-11511.
- [10] Tang Y Q, Zhang X Y, Li D D, Wang H M, Chen F S, Fu X L, Fang X M, Sun X M, Yu G R. Impacts of nitrogen and phosphorus additions on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and denitrifying bacteria in Chinese fir plantations. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 103: 284-293.
- [11] Alexander J M, Kueffer C, Daehler C C, Edwards P J, Pauchard A, Seipel T, MIREN Consortium. Assembly of nonnative floras along elevational gradients explained by directional ecological filtering. *PNAS* 2011, 108(2): 656-661.
- [12] Zhang X M, Johnston E R, Liu W, Li L H, Han X G. Environmental changes affect the assembly of soil bacterial community primarily by mediating stochastic processes. *Global Change Biology*, 2016, 22(1): 198-207.
- [13] 高宛宛,侯磊,卢杰,等.海拔与林隙对色季拉山急尖长苞冷杉林土壤线虫群落的影响.生态学报, 2024, 43(6): 1540-1548.
- [14] 邓米林,叶桂萍,胥超,宛颂,贺纪正,林永新.天然林转人工林对亚热带森林土壤团聚体中亚硝酸盐还原基因丰度的影响.应用生态学报, 2023, 34(1): 25-30.
- [15] Fan K K, Delgado-Baquerizo M, Guo X S, Wang D Z, Wu Y Y, Zhu M, Yu W, Yao H Y, Zhu Y G, Chu H Y. Suppressed N fixation and diazotrophs after four decades of fertilization. *Microbiome*, 2019, 7(1): 143.
- [16] 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. *Research in Microbiology*, 2001, 152(1): 95-103.
- [17] Li J B, Shen Z H, Li C N, Kou Y P, Wang Y S, Tu B, Zhang S H, Li X Z. Stair-step pattern of soil bacterial diversity mainly driven by pH and vegetation types along the elevational gradients of Gongga Mountain, China. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 569.
- [18] Liao H K, Li Y Y, Yao H Y. Fertilization with inorganic and organic nutrients changes diazotroph community composition and N-fixation rates. *Journal of Soils and Sediments*, 2018, 18(3): 1076-1086.
- [19] 马和平,郭其强,刘合满,钱登锋.西藏色季拉山东麓垂直土壤碳氮分布特征及其影响因素.西北农林科技大学学报:自然科学版, 2013, 41(1): 91-96.
- [20] Vitousek P M, Hobbie S. Heterotrophic nitrogen fixation in decomposing litter: patterns and regulation. *Ecology*, 2000, 81(9): 2366.
- [21] Hell K, Edwards A, Zarsky J, Podmirseg S M, Girdwood S, Pachebat J A, Insam H, Sattler B. The dynamic bacterial communities of a melting High Arctic glacier snowpack. *The ISME Journal*, 2013, 7(9): 1814-1826.
- [22] Achberger A M, Michaud A B, Vick-Majors T J, Christner B C, Skidmore M L, Priscu J C, Tranter M. Microbiology of subglacial environments.

- Margolin R. Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology. Cham: Springer, 2017: 83-110.
- [23] Brown J H. Mammals on mountainsides: elevational patterns of diversity. *Global Ecology and Biogeography*, 2001, 10(1): 101-109.
- [24] 邓小军, 朱柳霏, 宋贤冲, 唐健, 谭一波, 邓楠楠, 郑威, 曹继钊. 猫儿山自然保护区不同林分类型土壤生态化学计量特征. *土壤通报*, 2022, 53(2): 366-373.
- [25] Mooshammer M, Wanek W, Hämmerle I, Fuchslueger L, Hofhansl F, Knoltsch A, Schneckner J, Takriti M, Watzka M, Wild B, Keiblinger K M, Zechmeister-Boltenstern S, Richter A. Adjustment of microbial nitrogen use efficiency to carbon: nitrogen imbalances regulates soil nitrogen cycling. *Nature Communications*, 2014, 5: 3694.
- [26] Wichard T, Mishra B, Myneni S C B, Bellenger J P, Kraepiel A M L. Storage and bioavailability of molybdenum in soils increased by organic matter complexation. *Nature Geoscience*, 2009, 2(9): 625-629.
- [27] Tang Y F, Zhang M M, Chen A L, Zhang W Z, Wei W X, Sheng R. Impact of fertilization regimes on diazotroph community compositions and N_2 -fixation activity in paddy soil. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2017, 247: 1-8.
- [28] van der Heijden M G A, Bardgett R D, van Straalen N M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 2008, 11(3): 296-310.
- [29] Lauber C L, Hamady M, Knight R, Fierer N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15): 5111-5120.
- [30] Fan K K, Weisenhorn P, Gilbert J A, Shi Y, Bai Y, Chu H Y. Soil pH correlates with the co-occurrence and assemblage process of diazotrophic communities in rhizosphere and bulk soils of wheat fields. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 121: 185-192.
- [31] 汪堃, 南丽丽, 师尚礼, 郭全恩. 干旱胁迫对不同根型苜蓿根系生长及根际土壤细菌的影响. *生态学报*, 2021, 41(19): 7735-7742.
- [32] Yang Y, Wang N, Guo X Y, Zhang Y, Ye B P. Comparative analysis of bacterial community structure in the rhizosphere of maize by high-throughput pyrosequencing. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0178425.
- [33] Zhang X M, Johnston E R, Liu W, Li L H, Han X G. Environmental changes affect the assembly of soil bacterial community primarily by mediating stochastic processes. *Global Change Biology*, 2016, 22(1): 198-207.
- [34] Chase J M. Stochastic community assembly causes higher biodiversity in more productive environments. *Science*, 2010, 328(5984): 1388-1391.
- [35] Hawkins C P, Mykrä H, Oksanen J, Vander Laan J J. Environmental disturbance can increase beta diversity of stream macroinvertebrate assemblages. *Global Ecology and Biogeography*, 2015, 24(4): 483-494.
- [36] Zhao Y M, Zhang L, Wang C F, Xie C X. Biology and ecology of grass carp in China: a review and synthesis. *North American Journal of Fisheries Management*, 2020, 40(6): 1379-1399.
- [37] 赵辉, 周运超. 不同母岩发育马尾松土壤固氮菌群落结构和丰度特征. *生态学报*, 2020, 40(17): 6189-6201.
- [38] 刘婷, 雷志刚, 陈述, 吴小红, 欧阳子都, 闫文德. 亚热带森林转换对土壤氮转化关键功能微生物群落的影响. *生态学报*, 2024, 44(9): 3636-3647.