

doi: 10.7522/j.issn.1000-0240.2013.0025

Kang Wenlong, Tai Xisheng, Li Shiweng, *et al.* 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 [J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2013, 35(1): 208–216. [康文龙, 台喜生, 李师翁, 等. 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[J]. 冰川冻土, 2013, 35(1): 208–216.]

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

康文龙¹, 台喜生², 李师翁^{1*}, 董 康¹,
刘光琇², 张 威²

(1. 兰州交通大学 化学与生物工程学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 中国科学院 寒区旱区环境与工程研究所 沙漠与沙漠化重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘 要: 对祁连山高寒草原碱性土壤可培养固氮菌数量、固氮基因(*nifH*)群落结构及其理化性质进行了研究. 结果表明: 固氮菌数量在土层 0~40 cm 处于 $3.6 \times 10^5 \sim 0.21 \times 10^5$ CFUs $\cdot$ g⁻¹ 之间, 除了海拔 3 001 m 的土样 AQ4 外, 其他 3 个土样固氮菌数量随着土壤深度的加深而减小. 固氮菌数量与地下生物量呈显著正相关性, 与有机碳、可溶有机氮、速效磷和速效钾呈正相关性, 而与 pH 值和全盐呈负相关性. 通过基因测序得到的 37 个固氮基因 *nifH* 克隆中, 蓝藻门占 41%, 变形菌门占 8%, 厚壁菌门占 14%, 未知菌株占 37%; 蓝藻门在除了 AQ4 外的土样中普遍存在, 并且是 AQ1 的优势固氮菌群. 此外, 还发现了 4 个新的 *nifH* 基因, 分别是 AQ1-12(KC412109)、AQ4-3(KC412133)、AQ4-4(KC412133)、AQ4-5(KC412133), 其中后三者是土样 AQ4 的优势种群.

关键词: 祁连山高寒草原; 碱性土壤; 固氮微生物; 固氮基因; 群落结构

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A

0 引言

氮是生命体最重要的元素之一, 是影响植物生长的关键元素而且需要量大. 大气成分中氮气的体积分数为 78%, 在自然界中的含量极为丰富, 但植物仅能吸收化合态的氮, 闪电可以将氮气转化成一氧化氮, 这部分含氮化合物只占固氮总量的 10%. 其次, 固氮微生物能将大气中的氮气通过固氮酶的作用还原成能被植物吸收利用的 NH_4^+ , 这种固氮微生物把大气中的氮气转化为化合态的氮的过程称之为生物固氮, 生物固氮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^[1].

目前发现的固氮微生物都属于原核生物界, 分 59 个属, 根据与其他生物的关系可以将其分为: 自

生固氮微生物、联合固氮微生物和共生固氮微生物^[2]. 这些固氮微生物体内存在一种具有催化功能的固氮酶, 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^[3]. 固氮酶和 *nifH* 基因只存在于固氮微生物中, *nifH* 基因是进化过程中最古老的功能基因之一^[4], 其系统进化关系和 16S rDNA 相一致. 所以, *nifH* 基因是研究固氮微生物群落结构最好的标记基因. 目前, 利用分子生物学的方法已经对海洋^[5]、淡水^[6]、盐沼^[7-8]、陆地^[9]及特殊的生境, 如白蚁内脏^[10-11]中的 *nifH* 基因的多样性进行了研究. 这些研究显示, 在不同自然环境中的 *nifH* 基因呈现出多样性和差异性, 固氮微生物的群落结构也显示出明显的差异^[3].

收稿日期: 2012-09-22; 修订日期: 2012-12-03

基金项目: 中国科学院重点部署项目(KZZD-EW-04-05); 国家自然科学基金项目(31070357; 91025002; 31100365)资助

作者简介: 康文龙(1988—), 男, 甘肃天水人, 2010年毕业于兰州交通大学, 现为兰州交通大学在读硕士研究生, 主要从事环境微生物研究.

* 通讯作者: 李师翁, E-mail: lishweng@mail.lzjtu.cn

祁连山脉处于青藏高原、黄土高原和蒙新荒漠的交汇处, 是中国西北干旱区和半干旱区的分界线。祁连山脉由于受到青藏高原气候和蒙新荒漠气候的共同影响, 气候呈现出水平差异和垂直梯度, 构成了独特的生物多样性, 是西北重要的生物基因库^[12]。韩玉竹等^[13]通过可培养的方法对祁连山土壤固氮微生物数量进行过研究; 另外, 研究者也对祁连山的高寒草地土壤微生物分布及其与土壤的关系进行分析^[14-16]; 李振东等^[17]对祁连山高寒草地优势植物珠芽蓼的内生固氮细菌进行了分离、鉴定, 并首次获得了球形芽孢杆菌编码铁蛋白的 *nifH* 基因序列。鉴于对祁连山高寒草原土壤 *nifH* 基因群落结构研究较少, 所以本研究通过构建 *nifH* 基因克隆文库的方法对 *nifH* 基因系统发育进行研究, 利用可培养的方法研究地区固氮微生物数量与土壤理化性质的关系, 目的在于揭示高寒碱性土壤中对植物生长极其重要的固氮微生物的结构和数量特征。

1 材料与方法

1.1 样品采集

土壤样品采集时间为 2011 年 8 月, 在青海省祁连县境内 4 个高寒草原地点采集土壤样品, 每个地点取 3 个平行。用正方形 5 点取样法采集土壤, 垂直取 0~10 cm、10~20 cm 和 20~40 cm 深度的土壤, 每个地点采样量一致, 均匀混合后装入灭菌的采样袋中, 带回实验室于 4 °C 保存备用。土壤样品数据见表 1。

1.2 土壤理化性质的测定

土壤 pH 值用酸度计 (PT-10, sartorius) 测定分析土/水 (1 : 2.5, w : v) 混合物; 土壤全盐量采用常规质量法, 速效磷含量采用碳酸氢钠法, 速效钾含量用火焰光度法, 有机碳采用外加热重铬酸钾容量法, 可溶有机氮用 C/N 分析仪 2100S (Elementar Vario-EL, Germany), 浸提液用 0.5 M K₂SO₄^[18], 土液比为 1 : 5 (w : v)。

1.3 可培养固氮微生物的培养

培养基选用阿须贝氏无氮培养基: KH₂PO₄ 0.2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, NaCl 0.2 g, CaCO₃ 5 g, 甘露醇 10 g, CaSO₄ · 2H₂O 0.1 g, 琼脂 18 g, 水 1 L, pH 7.0。

在超净台中取土样 2 g, 置于灭菌处理过的装有 18 mL 生理盐水 (0.85%) 和玻璃珠的三角瓶中, 250 rpm 震荡 15 min; 取悬液进行梯度稀释, 稀释倍数为 10⁻² 和 10⁻³, 将稀释的土壤悬液 200 μL 涂布到阿须贝氏无氮培养基上, 每个土样的每个梯度均做 3 个平行, 培养温度为 20 °C 恒温, 7 d 后进行菌落计数。

1.4 土壤总 DNA 的提取

土壤总 DNA 用 MO BIO 公司的 PowerSoil DNA Isolation Kit 试剂盒提取。

1.5 固氮基因(*nifH*)的 PCR 扩增

固氮基因(*nifH*)的扩增引物序列: *nifH*-F 和 *nifH*-R [5'-AAAGG(C/T)GG(A/T)ATCGG (C/T)AA(A/G)TCCACCAC-3' 和 5'-TTGTT(G/C)GC (G/C)GC(A/G)TACAT (G/C)GCCATCAT-3']。

表 1 土壤样品采集位置及概况

Table 1 Sampling locations and situation of the soils

土样编号	海拔 /m	经度 /E	纬度 /N	优势植物	盖度 /%	地上生物量 /(g · m ⁻²)	土壤深度 /cm	地下生物量 /(g · 0.1 m ⁻³)
AQ1	2 631	100°10'51.3"	38°15'33.5"	芨芨草	30	250	0~10	1 564
							10~20	1 088
							20~40	289
AQ2	2 749	100°09'42"	38°15'21"	甘青针茅, 芨芨草	38	145	0~10	833
							10~20	986
							20~40	177
AQ3	2 911	100°13'05"	38°15'03"	甘青针茅, 苔草, 狼毒	96	469	0~10	1 768
							10~20	901
							20~40	418
AQ4	3 001	100°08'35"	38°15'46"	甘青针茅, 苔草, 火绒草	71	257.5	0~10	425
							10~20	1360
							20~40	0

该引物可以从土壤总 DNA 中扩增到大约 460 bp 的目的基因片段^[19]。

PCR 反应体系 (25 μL) : 2.5 μL 10 $\times$ PCR Buffer (+ (NH₄)₂SO₄, -MgCl₂), 0.5 μL 10 mM dNTP, 3 μL 25 mM MgCl₂, 2 μL 10 μM 引物, 0.2 μL 5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq DNA 聚合酶 (Thermo Scientific). 采用常规 PCR 扩增方法: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min.

1.6 固氮基因 (*nifH*) 克隆文库的构建

1.6.1 扩增产物回收

1.5% 琼脂糖电泳 PCR 扩增产物, 割胶, 然后用 Axygen 公司的 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收目的 DNA.

1.6.2 目的 DNA 与载体连接

目的 DNA 用 pMD18-T vector 载体试剂盒 (TaKaRa) 连接.

1.6.3 连接产物转化

将感受态细胞在冰盒中溶解, 然后把连接产物 (10 μL) 加入到 200 μL 的感受态细胞中, 冰浴 30 min; 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 90 s, 冰浴 5 min; 加入 800 μL LB 液体培养基, 在摇床 (150 r $\cdot\text{min}^{-1}$) 上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h; 8 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min 后弃上清液, 将菌液混合物涂布于含 Amp (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 14 h.

1.6.4 克隆 *nifH* 片段的扩增和检测

将平板上的白色单菌落挑出后接种于含 Amp (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡 (150 r $\cdot\text{min}^{-1}$) 培养 5 h, 然后进行克隆 *nifH* 片段的扩增, 25 μL 体系中加入 1 μL 菌液进行菌液 PCR, 以 pMD18-T 载体的特异性引物 M13 为扩增引物: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 33 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 用 1.5% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物, 620 bp 条带左右的对应克隆为阳性克隆 *nifH* 片段.

1.6.5 限制性酶切

将阳性克隆 PCR 扩增产物用限制性内切酶进行酶切, 选用的内切酶为 Alu I 和 Hae III. 20 μL 的反应体系含有 Alu I 和 Hae III 各 0.5 μL (10 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 去离子 H₂O 2 μL , 阳性克隆 PCR 扩增产物 15 μL , 10 $\times$ 缓冲液 2 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 16 h. 酶切后用 2% 琼脂糖电泳检测.

1.7 系统发育分析

克隆文库的覆盖率采用公式: $C=1-n/N$ 计

算. 式中: n 为只代表一个克隆子的 OTU 数; N 为阳性克隆子总数. 选择不同谱带类型的对应的克隆进行基因测序, 测序由上海生工生物有限公司完成. 利用 BLAST search 将测定得到的基因序列在 NCBI 数据库中进行在线比对, 得到最相似的 *nifH* 基因参比序列, 然后通过 Mega5 中的 Neighbor-Joining 法构建 *nifH* 基因系统发育树, 并通过 Bootstrap 法对树型进行评估分析^[20].

1.8 核苷酸序列 GenBank 登录号

将测序获得的 *nifH* 序列提交 GenBank 数据库, 数据库登录号为: KC412099-KC412135.

2 研究结果

2.1 土壤理化性质与可培养固氮菌数量分析

从表 1 可以看出, 植被盖度和地上生物量及地下生物量最高的土壤是海拔 2 911 m 的高寒草原 AQ3, 这 4 个地点的植物都是耐寒抗旱植物, 是祁连山高寒草原主要的植被类型^[21]. 样点 AQ1、AQ3 地下植物量随着土层深度的加深而逐渐减少, 说明这两个样点植物根系在浅层处最发达, 而样点 AQ2 和 AQ4 地下生物量在 10~20 cm 处最大, 表明植物根系分布较前两个地点深.

土壤 pH 值、有机碳、可溶性有机氮、全盐、速效磷和速效钾是土壤重要的理化性质. 表 2 显示出 4 个位点土壤最显著的特点是 pH 值均在 8.0 以上, 都属于碱性土壤, 而且随着土层的加深, pH 值也有增加的趋势, 土壤全盐随土壤深度增加而升高, 而其余各因子随土壤深度增加而降低.

相关性分析表明, 可培养固氮菌的数量与海拔高度并无显著的相关性, 前 3 个海拔高度土样 AQ1、AQ2 和 AQ3 随着土壤深度的增加可培养固氮菌数逐渐减少, 而海拔 3 001 m 土样 AQ4 在 10~20 cm 深度的可培养固氮菌数高于 0~10 cm 的菌数 (图 1).

可培养固氮菌数与土壤深度极显著负相关, 与地下生物量显著正相关. 土壤理化性质之间也有相关性关系, 最明显的是土壤深度和土壤 pH 值与其他土壤理化性质之间的关系. 土壤深度与土壤 pH 值极显著正相关, 与速效磷、地下生物量极显著负相关, 与有机碳、可溶有机氮显著负相关. 土壤 pH 值与有机碳、速效磷、速效钾极显著负相关, 与可溶有机氮显著负相关 (表 3).

2.2 固氮基因 *nifH* 克隆文库分析

将各样地 3 个平行土样的 DNA 合并后构建固

表 2 土壤理化性质

Table 1 Physicochemical properties of the studied soils

土样编号	土壤深度 /cm	pH 值	有机碳 /(g·kg ⁻¹)	可溶有机氮 /(mg·kg ⁻¹)	全盐 /%	速效磷 /(mg·kg ⁻¹)	速效钾 /(mg·kg ⁻¹)
AQ1	0~10	8.40	23.97	74.00	7.261	2.50	79.2
	10~20	8.70	14.88	64.65	9.605	0.74	74.3
	20~40	8.86	8.19	31.40	7.626	0.24	114.2
AQ2	0~10	8.24	83.68	109.50	0.488	3.78	223.9
	10~20	8.27	54.24	76.25	1.532	1.58	188.0
	20~40	8.37	35.82	67.85	3.283	0.17	110.5
AQ3	0~10	8.08	49.37	194.00	0.513	7.16	463.0
	10~20	8.37	44.10	211.50	0.595	3.34	320.6
	20~40	8.94	13.01	91.60	1.436	0.46	127.0
AQ4	0~10	8.19	38.30	152.10	0.568	3.42	435.1
	10~20	8.60	26.37	92.30	0.158	0.74	117.8
	20~40	8.83	15.31	34.75	1.747	0.24	75.7

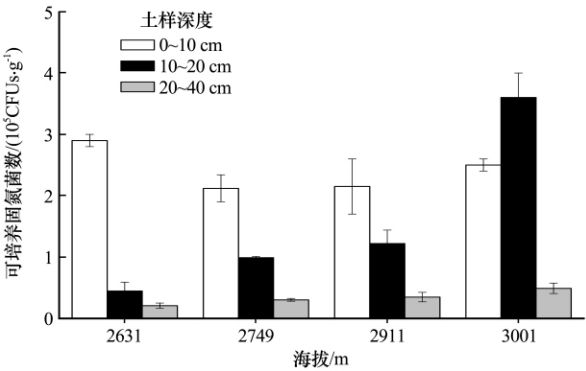


图 1 土壤样品中可培养固氮菌数量

Fig. 1 The number of culturable nitrogen-fixing bacteria in the soil samples

氮基因 *nifH* 克隆文库，从每个样地各选择 48 个阳性克隆进行酶切，得到的 DNA 谱带类型通过人

工分析，相同的谱带类型代表一个 OTU。固氮基因 *nifH* 克隆文库指标如表 4 所示。

从表 5 可以看出，OTU 的数量与地下生物量显著正相关，说明在该地区高寒草原生态系统中地下生物量对固氮基因 *nifH* 的多样性有一定的影响。

通过基因测序得到 37 个固氮基因 *nifH* 克隆(图 2)。从图 2 可以看出，固氮基因 *nifH* 克隆中与蓝藻门(Cyanobacteria)具有较高相似性的占 41%，变形菌门(Proteobacteria)占 8%，厚壁菌门(Firmicutes)占 14%，未知菌株(Unidentified bacterium)占 37%。与蓝藻门相似的序列相似度为 87%~90%，分为 3 个属，分别为念珠藻属(*Nostoc*)、鱼腥藻属(*Anabaena*)、筒孢藻属(*Cylindrospermum*)，分别占到蓝藻门相似序列的 47%，47%

表 3 土壤可培养固氮菌数与土壤理化因子之间的相关性

Table 3 Correlation analysis between the number of culturable nitrogen-fixing bacteria and physicochemical factors

	可培养菌数	深度	pH 值	全盐	有机碳	可溶有机氮	速效磷	速效钾	地下生物量
可培养菌数	1	-0.76**	-0.51	-0.339	0.344	0.387	0.483	0.34	0.653*
土壤深度		1	0.759**	0.163	-0.597*	-0.578*	-0.752**	-0.564	-0.75**
pH			1	0.393	-0.796**	-0.638*	-0.775**	-0.714**	-0.472
全盐				1	-0.549	0.555	0.387	0.556	0.027
有机碳					1	0.498	0.622*	0.521	0.275
可溶有机氮						1	0.807**	0.868**	0.43
速效磷							1	0.851**	0.602*
速效钾								1	0.266
地下生物量									1

注：**为 $p<0.01$ ；*为 $p<0.05$ 。

表 4 固氮基因 *nifH* 克隆文库指标
Table 4 Clone library index of *nifH*

	AQ1	AQ2	AQ3	AQ4
阳性克隆数	48	48	48	48
文库覆盖率/%	94	96	96	98
OTUs	13	7	12	5

和 6%，其中与筒孢藻属相似序列只有一个，为 AQ1-8。土样 AQ1 包含了这 3 个属，有 5 条序列为念珠藻属，有 4 条序列为鱼腥藻属。AQ2 中与蓝藻门相似的 3 条序列属于鱼腥藻属，土样 AQ3 中有 2 条序列为念珠藻属，属于鱼腥藻属的只有 1 条序列。而土样 AQ4 中没有序列与蓝藻门相似。与变形菌门相似序列总共有 3 条，全为土样 AQ3 的序列，相似度为 98%，分为中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*) 和根瘤菌属 (*Rhizobium*)。与厚壁菌门相似序列总共有 5 条，土样 AQ2 中有 4 条，土样 AQ4 中有 1 条，相似度为 94%~95%，都属于类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)。剩余的序列与未培养细菌 *nifH* 基因相似，相似度为 72%~99%。

3 讨论

研究结果显示，固氮菌数量在 $3.6 \times 10^5 \sim 0.21 \times 10^5 \text{ CFUs} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间。韩玉竹等^[13]对 4 种东祁连山高寒草地的固氮菌数量进行了研究，显示土壤固氮菌数量在 $11.7 \times 10^5 \sim 89.4 \times 10^5 \text{ CFUs} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间；张俊忠^[14]研究的祁连山固氮菌数量在 $10^6 \text{ CFUs} \cdot \text{g}^{-1}$ 左右。本研究结果中固氮菌数量明显低于前人在祁连山的研究报道，这可能与本研究中土壤 pH 值较高有关。姚拓等^[15]研究对比了 1982 年与 2003 年相同地点天祝高寒草地土壤理化性质与好气性固氮菌的差异，发现随着土壤的退化，土壤 pH 值升高，好气性固氮菌数量明显减少。与前人的研究结果一致^[13-14, 22-24]，本研究中可培养固氮菌数量随着土层深度的加深而明显减少(图 1)，这可能是因为可在培养固氮菌中好氧自生固氮菌数目占明显的优势，因此随着土壤深度的增大，氧含量减小，好氧自生固氮菌数量也随之减少^[13]，而厌氧性固氮菌数量随着土层深度的加深而增加^[13, 16]。

土样 AQ4 在 10~20 cm 土层处的菌落数最大，而此处地下生物量也明显大于 0~10 cm 处，达到 $1.360 \text{ g} \cdot 0.1 \text{ m}^{-3}$ (表 1)，说明固氮微生物与植物根际之间有着密切的关系^[25-26]。从图 2 中得知土样 AQ4 中存在特殊的 *nifH* 基因群落，表明存在特殊的固氮微生物群落，此群落在 10~20 cm 处可能是优势菌群。这两个原因决定了土样 AQ4 在 10~20 cm 处可培养固氮菌数量高于其他位点。从表 3 可看出，固氮菌数量与地下生物量呈显著正相关性，与有机碳、可溶有机氮、速效磷和速效钾呈正相关性，而与 pH 值和全盐呈负相关性，但都不是显著相关。而高安社^[26]研究显示固氮菌数量与土壤全氮、有机碳、速效钾、速效磷有显著的负相关关系，说明土壤理化性质对不同土壤固氮菌和微生物数量的影响不同^[27-29]。

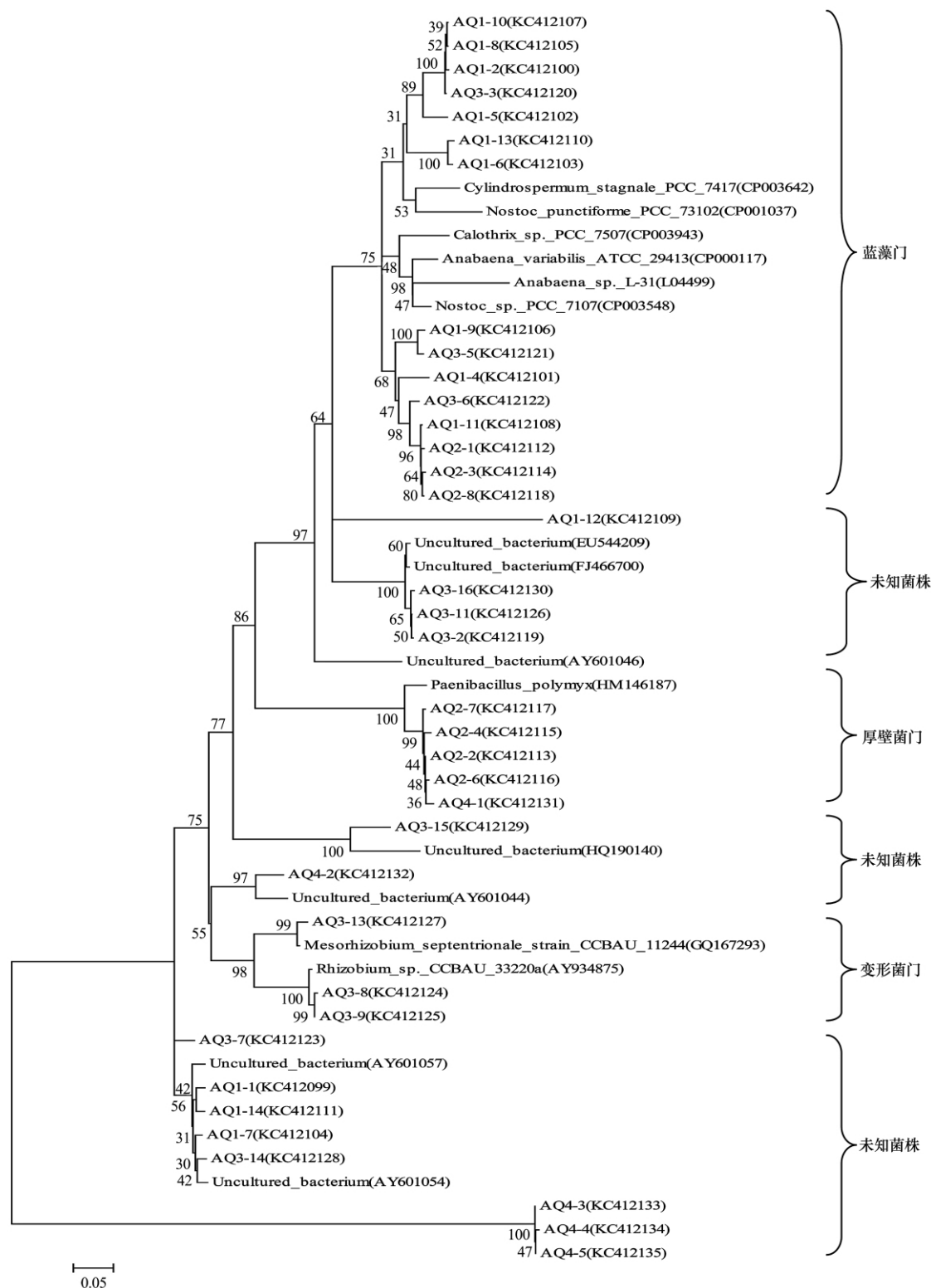
本研究获得的 OTU 数量为 37 个，在三江源高寒草原中 *nifH* 基因 OTU 数量普遍大于祁连山高寒草原碱性土壤的 *nifH* 基因 OTU 数量。对比土壤的理化性质可知，三江源高寒草甸土壤 pH 最大值为 7.66，而祁连山高寒草原土壤 pH 最小值为 8.08，这是二者理化性质最明显的差异^[30-32]。由此推断，pH 值的差异影响到 *nifH* 基因的种类多样性，而且 pH 值与 OTU 数量负相关。原因是，多数细菌的最适 pH 值是 6.5~7.5，高于 8.0 的碱性土壤会对细菌的生长产生不利的影响，包括固氮微生物的生长，只有那些耐碱性的固氮微生物才能在此环境下生长。本研究显示，除了 AQ4 土样外，蓝藻门 (Cyanobacteria) 在祁连山高寒草原碱性土壤中普遍存在，这与在江西红壤中的研究结果一致^[33]，并且是土样 AQ1 的优势固氮菌群。蓝藻门 (Cyanobacteria) 一般是水生环境中的优势固氮菌群^[3]，同时也是干旱区土壤结皮和北极土壤中主要的固氮菌群^[34-36]，蓝藻门 (Cyanobacteria) 耐受干旱和湿润环境的能力使得它们在该地区生存^[37]，此现象也存在于南极洲干旱的山谷土壤中^[38]。在 AQ4 号土样中，克隆的 AQ4-3 (KC412133)、AQ4-4 (KC412134) 和 AQ4-5 (KC412135) *nifH* 基因序列在 GenBank 中未发现相似序列，在土样 AQ1 中

表 5 OTUs 与土壤理化因子之间的相关性分析

Table 5 Correlation analysis between OTUs and physicochemical factors

	可培养菌数	pH 值	全盐	有机碳	可溶有机氮	速效磷	速效钾	地下生物量	地上生物量
OTUs	0.329	0.242	0.644	-0.425	-0.136	0.255	-0.371	0.970*	0.513

注：* 为 $p < 0.05$ 。

图2 *nifH* 基因克隆文库系统树Fig. 2 Phylogenetic tree of *nifH* gene clone library

克隆的 AQ1-12 (KC412109) 序列与 GenBank 中的相似序列相似度只有 72%, 通过编码蛋白分析得知, 这 4 条序列都能编码固氮酶还原酶蛋白 (dinitrogenase reductase), 所以这 4 条 *nifH* 基因是新的 *nifH* 基因, 而且 AQ4 号土样中 AQ4-3

(KC412133)、AQ4-4 (KC412134) 和 AQ4-5 (KC412135) 基因是优势基因, 揭示了该区域生长着新的固氮微生物, 而且是 AQ4 号土样中的优势种群。

本文通过可培养计数和构建克隆文库的方法揭

示了固氮菌群的数量和结构特征,发现了祁连山高寒碱性土壤中有丰富的固氮微生物资源。例如,发现了4条新的编码固氮酶还原酶蛋白的 *nifH* 基因。然而,基于可培养计数和克隆文库方法不能从中获得有潜在应用价值的固氮菌种。下一步有必要对该地区可培养固氮微生物进行分离和鉴定,获得相应的固氮菌株,并测定分离菌株的固氮能力和生理生化特征,这对于高山生态系统的保护和恢复有重要的意义。

参考文献(References):

- [1] Zhang Qiulei, Lin Min, Ping Shuzhen. Biological nitrogen fixation and its application in sustainable agriculture [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(2): 1—4. [张秋磊, 林敏, 平淑珍. 生物固氮及在可持续农业中的应用[J]. *生物技术通报*, 2008(2): 1—4.]
- [2] Song Chengjun, Ma Keming, Fu Bojie, *et al.* A review on the functions of nitrogen-fixers in terrestrial ecosystems [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(2): 869—877. [宋成军, 马克明, 傅伯杰, 等. 固氮类植物在陆地生态系统中的作用研究进展[J]. *生态学报*, 2009, 29(2): 869—877.]
- [3] Zehr J P, Jenkins B D, Short S M, *et al.* Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(7): 539—554.
- [4] Zhang Jing, Zhang Huiwen, Li Xinyu, *et al.* Soil microbial ecological process and microbial functional gene diversity [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(6): 1129—1132. [张晶, 张惠文, 李新宇, 等. 土壤微生物生态过程与微生物功能基因多样性[J]. *应用生态学报*, 2006, 17(6): 1129—1132.]
- [5] Zehr J P, Mellon M T, Zani S. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(9): 3444—3450.
- [6] MacGregor B J, Van Mooy B, Baker B J, *et al.* Microbiological, molecular biological and stable isotopic evidence for nitrogen fixation in the open waters of Lake Michigan[J]. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(3): 205—219.
- [7] Bagwell C E, Lovell C R. Persistence of selected *Spartina alterniflora* rhizoplane diazotrophs exposed to natural and manipulated environmental variability [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(11): 4625—4633.
- [8] Lovell C R, Piceno Y M, Quattro J M, *et al.* Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(9): 3814—3822.
- [9] Widmer F, Shaffer B T, Porteous L A, *et al.* Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(2): 374—380.
- [10] Lilburn T G, Kim K S, Ostrom N E, *et al.* Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes[J]. *Science*, 2001, 292(5526): 2495—2498.
- [11] Ohkuma M, Noda S, Kudo T. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(11): 4926—4934.
- [12] Liu Xiande, Wang Jinye. Prospects and reviews on the studies of biodiversity in Qilian Mountains [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2001, 16(Suppl.): 58—61. [刘贤德, 王金叶. 祁连山生物多样性研究回顾与展望[J]. *西北林学院学报*, 2001, 16(增): 58—61.]
- [13] Han Yuzhu, Chen Xiurong, Wang Guorong, *et al.* Distribution characteristics of soil micro-organism in alpine grassland of Eastern Qilian Mountains [J]. *Pratacultural Science*, 2007, 24(4): 14—18. [韩玉竹, 陈秀蓉, 王国荣, 等. 东祁连山高寒草地土壤微生物分布特征初探[J]. *草业科学*, 2007, 24(4): 14—18.]
- [14] Zhang Junzhong. Ecological Distribution of Soil Microbial Physiological Groups of Alpine Grassland in the Eastern Qilian Mountains and Identification of the Dominant Fungi [D]. Master Thesis, Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2003. [张俊忠. 东祁连山高寒草地土壤微生物生理类群的生态分布及优势真菌的鉴定[D]. 硕士论文, 兰州: 甘肃农业大学, 2003.]
- [15] Yao Tuo, Wang Gang, Zhang Degang, *et al.* Temporal changes of grassland vegetation, soil and soil microbial population in the Tianzhu alpine region[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(6): 1926—1932. [姚拓, 王刚, 张德罡, 等. 天祝高寒草地植被、土壤及土壤微生物时间动态的比较[J]. *生态学报*, 2006, 26(6): 1926—1932.]
- [16] Ding Lingling, Qi Biao, Shang Zhanhuan, *et al.* Dynamics of different soil microbial physiological groups and their relationship to soil conditions under sub-alpine grasslands vegetation in the eastern Qilian Mountain [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2007, 16(2): 9—18. [丁玲玲, 祁彪, 尚占环, 等. 东祁连山亚高山草地土壤微生物功能群数量动态及其与土壤环境关系[J]. *草业学报*, 2007, 16(2): 9—18.]
- [17] Li Zhendong, Chen Xiurong, Li Peng, *et al.* Identification of endogenous nitrogen-fixing bacteria of *Polygonum viviparum* and analysis on nitrogen fixation gene (*nifH*) [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2009, 17(5): 552—557. [李振东, 陈秀蓉, 李鹏, 等. 珠芽蓼内生固氮菌鉴定及其固氮基因分析[J]. *草地学报*, 2009, 17(5): 552—557.]
- [18] Jones D L, Willett V B. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(5): 991—999.
- [19] R sch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3818—3829.
- [20] Zhang Gaosen, Zhang Wei, Liu Guangxiu, *et al.* Distribution of aerobic heterotrophic bacteria managed by environmental factors in glacier foreland[J]. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2012, 34(4): 965—971. [章高森, 张威, 刘光琇, 等. 环境因素主导着冰川前沿裸露地好氧异养细菌群落的分布[J]. *冰川冻土*, 2012, 34(4): 965—971.]
- [21] Ding Songshuang, Su Peixi. Altitudinal variation characteristics of the plant community on the upper reaches of Heihe River in the Qilian Mountains [J]. *Journal of Glaciology and*

- Geocryology, 2010, **32**(4): 829—836. [丁松爽, 苏培玺. 黑河上游祁连山区植物群落随海拔生境的变化特征[J]. 冰川冻土, 2010, **32**(4): 829—836.]
- [22] Zhao Youyi, Cai Liqun, Wang Jing, *et al.* Effects of different conservation tillage on amount and distribution of soil ammonifying bacteria, nitrobacteria and nitrogen-fixing bacteria [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2009, **18**(4): 125—130. [赵有翼, 蔡立群, 王静, 等. 不同保护性耕作措施对三种土壤微生物氮素类群数量及其分布的影响[J]. 草业学报, 2009, **18**(4): 125—130.]
- [23] Wang Sujuan, Su He, Gao Li. The preliminary research on soil microorganism quantity at Kubuqi Sandland[J]. Chinese Journal of Grassland, 2008, **30**(6): 89—93. [王素娟, 苏和, 高丽. 库布齐沙地土壤微生物数量初步研究[J]. 中国草地学报, 2008, **30**(6): 89—93.]
- [24] Ning Yuanying, Xu Jie, Zhang Gong. Vegetation components and microbe quantity in microbiotic soil crusts of the grazing land during natural restoration in Horqin Sand Land, Inner Mongolia [J]. Journal of Inner Mongolia University, 2009, **40**(6): 670—676. [宁远英, 徐杰, 张功. 科尔沁沙地放牧干扰恢复过程中植被组成和生物结皮微生物数量的变化[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2009, **40**(6): 670—676.]
- [25] Yao Tuo, Long Ruijun, Shi Shangli, *et al.* Populations of soil nitrogen bacteria groups in alpine steppe of different disturbed habitats in Tianzhu[J]. Acta Pedologica Sinica, 2007, **44**(1): 122—129. [姚拓, 龙瑞军, 师尚礼, 等. 高寒草地不同扰动生境土壤微生物氮素生理群数量特征研究[J]. 土壤学报, 2007, **44**(1): 122—129.]
- [26] Gao Anshe. Ecosystem Health Assessment on Grazing Land of *Leymus chinensis* Steppe[D]. PhD Thesis, Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2005. [高安社. 羊草草原放牧地生态系统健康评价[D]. 博士论文, 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005.]
- [27] Liu Guangxiu, Dong Xiaopei, Zhangwei, *et al.* The changing mechanisms of microbial number on surface soil with altitude [J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2010, **32**(6): 1170—1174. [刘光琇, 董小培, 张威, 等. 不同海拔表层土壤微生物数量消长的机理[J]. 冰川冻土, 2010, **32**(6): 1170—1174.]
- [28] Wang Lu, Dong Xiaopei, Zhang Wei, *et al.* Quantitative characters of microorganisms in permafrost at different depths and their relation to soil physicochemical properties[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2011, **33**(2): 436—441. [王鹭, 董小培, 张威, 等. 不同深度冻土微生物数量特征及其与土壤理化性质的关系[J]. 冰川冻土, 2011, **33**(2): 436—441.]
- [29] Niu Shiquan, Li Junfeng, Yang Tingting, *et al.* The relationships of soil microbial biomass, physicochemical factors and soil enzyme activities in Maqu swamp wetland of Gannan Prefecture [J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2010, **32**(5): 1022—1029. [牛世全, 李君锋, 杨婷婷, 等. 甘南玛曲沼泽湿地土壤微生物量、理化因子与土壤酶活的关系[J]. 冰川冻土, 2010, **32**(5): 1022—1029.]
- [30] Zhang Yuguang, Wang Huimin, Li Diqiang, *et al.* The community and structure of nitrogen-fixing microorganism in Sanjiangyuan Natural Reserve [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, **45**(3): 420—425. [张于光, 王慧敏, 李迪强, 等. 三江源地区不同植被土壤固氮微生物的群落结构研究[J]. 微生物学报, 2005, **45**(3): 420—425.]
- [31] Zhang Y, Li D, Wang H, *et al.* Molecular diversity of nitrogen-fixing bacteria from the Tibetan Plateau, China [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, **260**(2): 134—142.
- [32] Zhang Yuguang, Wang Huimin, Li Diqiang, *et al.* Molecular diversity and phylogenetic analysis of nitrogen-fixing (*nifH*) genes in alp prairie soil of Sanjiangyuan natural reserve [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, **45**(2): 166—171. [张于光, 王慧敏, 李迪强, 等. 三江源高寒草甸土固氮基因(*nifH*)的多样性和系统发育研究[J]. 微生物学报, 2005, **45**(2): 166—171.]
- [33] Teng Q, Sun B, Fu X, *et al.* Analysis of *nifH* gene diversity in red soil amended with manure in Jiangxi, south China [J]. The Journal of Microbiology, 2009, **47**(2): 135—141.
- [34] Belnap J. Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Utah, USA [J]. Biology and Fertility of Soils, 2002, **35**(2): 128—135.
- [35] Yeager C M, Kornosky J L, Morgan R E, *et al.* Three distinct clades of cultured heterocystous cyanobacteria constitute the dominant N₂-fixing members of biological soil crusts of the Colorado Plateau, USA [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, **60**(1): 85—97.
- [36] Eckford R, Cook F D, Saul D, *et al.* Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated Antarctic soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68**(10): 5181—5185.
- [37] Cavacini P. Soil algae from northern Victoria Land (Antarctica)[J]. Polar Bioscience, 2001, **14**: 45—60.
- [38] Wood S A, Rueckert A, Cowan D A, *et al.* Sources of e-daphic cyanobacterial diversity in the Dry Valleys of Eastern Antarctica [J]. The ISME Journal, 2008, **2**(3): 308—320.

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

KANG Wen-long¹, TAI Xi-sheng², LI Shi-weng¹, DONG Kang¹, LIU Guang-xiu², ZHANG Wei²

(1.School of Chemical and Biological Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou Gansu 730070, China ;

2.Key laboratory of Desert and Desertification, Cold and Arid Regions Environmental and Engineering

Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou Gansu 730000, China)

Abstract: The physicochemical characteristics, the number of culturable nitrogen-fixing bacteria and the community structure of nitrogen-fixing (*nifH*) genes in the alkali soils of alpine steppe in the Qilian Mountains are investigated in the present study. It is found that the number of culturable nitrogen-fixing bacteria is between $3.6 \times 10^5 \sim 0.21 \times 10^5$ CFUs $\cdot$ g⁻¹ within the depth of 0–40 cm. The number of nitrogen-fixing bacteria decreases with soil depth in three soil samples, except one sample (AQ4) at the altitude of 3 001 m.

The number of nitrogen-fixing bacteria has a significant positive correlation with the underground biomass, and positive correlations with organic carbon, soluble organic nitrogen, rapidly available phosphorus and rapidly available potassi-

um. However, it has negative correlations with soil pH value and total salt. Gene sequencing shows that in a community structure of 37 nitrogen-fixing (*nifH*) genes there are Cyanobacteria genes (41%), Proteobacteria genes (8%), Firmicutes genes (14%) and unknown bacterium genes (37%). Cyanobacteria genes exist in all soil samples, except for the sample AQ4, and are dominate nitrogen-fixing (*nifH*) genes in the sample AQ1. It is also found four new nitrogen-fixing (*nifH*) genes. They are AQ1-12 (KC412109), Q4-3 (KC412133), AQ4-4 (KC412133) and AQ4-5 (KC412133), among which AQ4-3 (KC412133), AQ4-4 (KC412133) and AQ4-5 (KC412133) are the dominate genes in sample AQ4.

Key words: alpine steppe in the Qilian Mountains; alkali soils; nitrogen-fixing microorganism; *nifH* genes; community structure