土 壤 学 报
Acta Pedologica Sinica

DOI: 10.11766/trxb202404150156 **CSTR: 32215.14.trxb202404150156**

胡漫，曾全超，周全，周连昊. 集约化种植柑橘土壤细菌群落多样性与生态系统多功能性的耦合机制研究[J]. 土壤学报，2025，

HU Man, ZENG Quanchao, ZHOU Quan, ZHOU Lianhao. Study on the Coupling Mechanism Between Soil Bacterial Community Diversity and Ecosystem Multifunctionality in Intensive Citrus Cultivation Systems[J]. Acta Pedologica Sinica, 2025,

集约化种植柑橘土壤细菌群落多样性与生态系统多功能性的耦合机制研究*

胡 漫 [1,2]，曾全超 [1†]，周 全 [1]，周连昊 [1,2]

（1.中国科学院重庆绿色智能技术研究院，重庆 400714；2.中国科学院大学, 北京 101408 ）

摘 要: 高度无序、单一种植导致土地退化，但高强度集约化柑橘种植对土壤微生物群落和多种土壤功能的影响仍不清楚。以不同柑橘种植年限土壤为研究对象，利用高通量测序研究了集约化强度对土壤微生物群落的影响，探究了土壤碳氮磷循环相关的多功能性与微生物多样性、共现网络的耦合机制。结果表明，随着柑橘种植年限的增加，土壤细菌多样性显著下降，香农指数从 5 a 的 7.05 下降至 30 a 的 5.79，物种数也从 2 110 下降至 1 153。相比于种植 5 a 的柑橘土壤，种植 30 a 的柑橘土壤微生物的网络复杂性更低，微生物类群更少，微生物类群之间的关联性也较低。长时间的柑橘种植导致土壤酸化和养分富集，直接影响细菌群落多样性，改变细菌群落结构和物种组成，导致土壤细菌生活史策略从寡营养型（K-策略）转变为富营养型（r-策略），增加了富营养型细菌群落（放线菌、变形菌）的相对丰度，降低了寡营养细菌群落（酸杆菌门）的相对丰度。微生物共现网络节点数与碳循环多功能性指数（CMF）呈负相关，与氮循环多功能性指数（NMF）、磷循环多功能性指数（PMF）均呈显著正相关，边数与 CMF 呈负相关，与 NMF 呈显著正相关，与 PMF 相关性不显著。总之，养分富集会减少土壤细菌多样性，并削弱地下微生物多样性与生态系统功能之间的关系，上述结果表明长时间的柑橘种植对土壤微生物多样性和多种生态功能具有显著的负效应，为养分富集影响土壤细菌群落和生态系统多功能性的耦合机制提供了新的见解。

关键词: 集约化种植；柑橘种植年限；土壤生态系统多功能性；土壤细菌群落多样性；微生物共现网络

中图分类号：S154.3 **文献标志码**：A

Study on the Coupling Mechanism Between Soil Bacterial Community Diversity and Ecosystem Multifunctionality in Intensive Citrus Cultivation Systems

HU Man[1,2], ZENG Quanchao[1†], ZHOU Quan[1], ZHOU Lianhao[1,2]

(1. *Chongqing Institute of Green and Intelligent Technology, Chinese Academy of Sciences, Chongqing* 400714*, China*; 2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 101408*, China*)

Abstract: 【Objective】Intensive monoculture practices can degrade land, but the specific impacts of long-term, high-intensity citrus cultivation on soil microbial communities and soil multifunctionality are not well understood.

*国家自然科学基金项目（42277351）和重庆市自然科学基金项目（CSTB2024NSCQ-MSX0803, CSTB2024NSCQ-QCXMX0092）资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 42277351) and the Natural Science Foundation of Chongqing, China (Nos. CSTB2024NSCQ-QCXMX0092 and CSTB2024NSCQ-MSX0803)

† 通讯作者 Corresponding author，E-mail：zengchao256@126.com

作者简介：胡 漫（2000—），女，重庆市铜梁人，硕士研究生，主要从事土壤有机碳的微生物周转机制研究。E-mail：human24@mails.ucas.ac.cn

收稿日期：2024-04-15；收到修改稿日期：2024-12-27；网络首发日期（www.cnki.net）：

【Method】This study examined soils from citrus orchards of varying planting durations, using high-throughput sequencing to assess the influence of intensive cultivation on soil microbial communities. It also investigated soil multifunctionality, microbial diversity, and co-occurrence networks associated with carbon, nitrogen, and phosphorus cycling. 【Results】This study indicated that soil bacterial diversity declined significantly as the duration of citrus cultivation increases. The Shannon index decreased from 7.05 in 5-year soils to 5.79 in 30-year soils, with species numbers dropping from 2 110 to 1 153. Microbial network complexity was also reduced in 30-year soils, with fewer taxa and fewer inter-taxa associations than in 5-year soils. Network nodes declined from 1 491 to 815, and edges from 8 449 to 2 369. Network complexity and stability varied significantly across citrus ages, with younger (5-year) soils showing greater complexity and stability than older (30-year) soils. Also, long-term citrus cultivation led to soil acidification, altering bacterial activity, community structure, and species composition. This included an increase in dominant taxa like Proteobacteria, Actinobacteria, and Firmicutes, and a decline in Acidobacteria, Chloroflexi, and Gemmatimonadetes. The relative abundance of nitrogen-cycling bacteria also increased, supporting processes such as nitrogen fixation, aerobic ammonia oxidation, denitrification, and aerobic nitrite oxidation. Changes in microbial diversity and structure correlated closely with shifts in soil multifunctionality, influenced by high-intensity citrus cultivation. The number of microbial network nodes showed a negative correlation with carbon cycle multifunctionality (CMF) and positive correlations with nitrogen cycle (NMF) and phosphorus cycle multifunctionality (PMF). The number of edges correlated negatively with CMF, positively with NMF, and was not significantly associated with PMF. 【Conclusion】Microbial diversity drives the complexity of microbial co-occurrence networks, significantly correlating with the number of network nodes and edges. Collectively, these findings indicate that prolonged citrus cultivation significantly reduces soil microbial diversity and impairs multiple ecological functions.

Key words: Intensive cultivation; Citrus cultivation duration; Soil ecosystem multifunctionality; Soil bacterial diversity; Microbial co-occurrence network

生态系统通常是多种生态功能同时发生，而非孤立进行，因此，需要通过综合测量多种功能（即多功能性，如养分循环、分解、初级生产和气候调节等）来评估。多功能性的评价将有助于更好地理解和预测土壤生态系统所提供的各种服务，以及这些服务如何应对生物多样性变化和环境变动。大量研究表明，生态系统功能与植物多样性呈正相关[1]。然而，与植物相比，关于土壤微生物多样性与生态系统功能之间关系的研究仍然有限，尤其是在农业生态系统中，多功能性与微生物耦合关系的机制尚不明确。微生物群落在同时维持多种生态系统功能和服务（生态系统多功能性）方面发挥着关键作用，包括养分循环、初级生产力、有机质分解和气候调节等[2]。在全球尺度上，微生物多样性与生态系统多功能性始终呈显著正相关，而人类活动和气候变化导致的微生物多样性丧失将降低多种生态系统功能和服务[3]。在受控条件下的实验表明，土壤生物的多样性可促进生态系统多功能性的稳定[4]。土地利用引起的土壤多功能性变化与微生物网络模块有关，但并不总是与微生物多样性的变化相关[5]。在解释生态系统多功能性的变化时，微生物多样性较植物多样性和土壤性质更为重要，细菌、真菌、放线菌、线虫、革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌的多样性与生态系统多功能性显著正相关[6]。然而，上述研究主要集中在自然生态系统，尚未明确阐明农业土壤微生物多样性与生态系统多功能性之间的关系。开展农业土壤生态系统多功能性评价有助于培育健康土壤，实现农业绿色发展[7]。

土壤微生物是多种生态系统功能稳定发挥的基础，影响能量流动和养分循环[8]。土壤微生物群落的组成、结构和功能对环境变化非常敏感，任何微生物群落的变化均会通过影响温室气体排放和养分循环等过程，对生态系统产生重要影响。鉴于土壤微生物多样性对于生态系统多功能性的重要作用[3]，亟需深入阐明农业集约化对土壤多种生态功能的影响及其微生物驱动机制。这将有助于调控退化土壤，并为农业绿色化提供技术指导。

柑橘因其高营养价值和经济效益被广泛种植，尤其是在三峡库区，成为当地农民的主要经济来源。近年来，在经济利益的驱动下，高强度、单一无序种植逐渐成为该地区柑橘发展的主要模式，严重影响了库区的土壤和水环境质量。已有研究表明，高强度集约化柑橘种植导致土壤酸化、解磷菌活性下降等问题[9]，并对多种土壤生态系统功能产生了影响，但其背后的机制，尤其是微生物学机制，仍不清楚。因此，本研究通过比较不同柑橘年限下土壤细菌群落的多样性、组成和网络复杂性，评估细菌群落对不同柑橘种植年限的响应。此外，为了更好地区分不同生态系统功能，本研究将碳循环多功能性（Carbon cycle multifunctionality， CMF）、氮循环多功能性（Nitrogen cycle multifunctionality，NMF）和磷循环多功能性（Phosphorus cycle multifunctionality， PMF）与土壤细菌群落的多样性、组成和网络复杂性进行关联分析，旨在阐明柑橘土壤细菌在调节不同生态系统功能中的作用机制，为退化果园的改良和绿色有机果园的发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

三峡库区属亚热带季风气候，年均温为 18.2 ℃，年均降水量约为 940 mm。该地区的土壤主要为紫色砂岩发育的紫色土。独特的气候和土壤条件为柑橘生长提供了良好的环境。秭归县位于三峡库区的上游，具有数百年的柑橘种植历史，被誉为“中国脐橙之乡”，实现了全年均可采摘鲜橙的奇迹。本研究选择秭归县水田坝乡（31°17′28″N,110°40′21″E）作为研究区域，该地区是典型的柑橘种植区，柑橘种植已成为当地农民的主要经济来源。随着柑橘种植规模的扩大，几乎所有的耕地均被种植为柑橘，而且在追求经济利益过程中，越来越多的林地被开发为柑橘园。高度无序、单一种植是目前三峡库区柑橘发展的主要态势，过量使用化肥等化学农用品导致土壤退化严重，影响土壤生态系统功能的稳定发挥和维持。

1.2 样品采集

2022 年 8 月，在水田坝乡中国科学院三峡工程生态环境秭归实验站附近采集了柑橘表层土壤样品。样品选择了不同种植年限的柑橘园（5 a 和 30 a），柑橘品种为纽荷尔脐橙（Newhall navel orange）。在每种年限的柑橘园中，选择了 21 个脐橙园，所有园区的地形条件相似，并采用开槽施基肥、穴施复合肥等常规管理方式进行施肥。在每个柑橘园中，随机选择 15 棵柑橘树进行样品采集，样品来自每棵树的滴水线附近的表层（0~5 cm）土壤。样品采集后，将每个柑橘园的土壤样品混合均匀，并去除根系和肉眼可见的杂物，然后利用四分法分装样品。新鲜样品放置于冰盒中，立即运回实验室进行土壤胞外酶活性和有效养分的测定。土壤 DNA 提取样品需立即放置于−80 ℃冰箱中保存。风干土壤样品主要用于测定土壤磷组分、pH 和土壤有机质（SOM）。

1.3 土壤理化性质分析

为了表征土壤的多种生态功能，选取了与土壤碳循环相关的指标，包括 β-1,4-葡萄糖苷酶（BG）、纤维二糖水解酶（CBH）和 SOM；与氮循环相关的指标，包括 β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶（NAG）、硝态氮（NO_3^--N）和铵态氮（NH_4^+-N）；与磷循环相关的指标，包括有效磷（AP）、矿物结合态磷（HCl-P）、有机酸态磷（Citrate-P）、可交换态磷（$CaCl_2$-P）和碱性磷酸酶（ALP）。根据《土壤农化分析》[10]的方法步骤，对不同柑橘种植年限的土壤 pH （0.01 mol·L^{-1} $CaCl_2$ 浸提）、SOM（重铬酸钾外加热法）、NO_3^--N、NH_4^+-N 和有效磷（Olsen-P 法）进行了测定。

为了测定不同活性的磷，采用不同浸提剂的方法分析土壤磷组分[11]。可交换态磷用 10 mmol·L^{-1} 的 $CaCl_2$ 提取，有机酸态磷采用 10 mmol·L^{-1} 的柠檬酸提取，矿物结合态磷采用 1 mol·L^{-1}HCl 提取。提取液的无机磷含量采用钼蓝比色分光光度法进行测定[12]。土壤胞外酶活性通过 96 微孔荧光法[13]测定，主要测定与土壤碳循环相关的 BG 和 CBH 酶，与氮循环相关的 NAG 酶以及与磷循环相关的 ALP 酶。具体测定步骤见参考文献[14]。

1.4 土壤 DNA 提取、PCR 扩增、qPCR 方法

柑橘土壤样品的 DNA 提取按照 DNA 试剂盒（MoBio Laboratories, Carlsbad, CA,美国）说明书进行逐步提取。提取后，利用 Nano drop 2000 （Thermo Scientific, Waltham, MA，美国）测定其浓度和纯度。质量合格的 DNA 置于−80 ℃的冰箱保存，待后续 PCR 扩增使用。

使用引物 515F（GTGCCAGCMGCCGCGG）和 806R（GGACTACHVGGGTWTCTAAT）对 16S rRNA 的 V4 可变区进行扩增。PCR 扩增条件为：98 ℃保持 60 s，然后进行 30 个循环，每个循环包括 55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 5 min，98 ℃变形 10 s，最后在 72 ℃延伸 5 min。扩增反应体系为 20 μL，包含 4 μL 5×PCR 缓冲液、2 μL 2.5 mmol·L^{-1} dNTP（脱氧核糖核苷三磷酸）、1 μL DNA、0.8 μL 引物、0.4 μL DNA 聚合酶。扩增产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测，经检测扩增成功后的 PCR 产物利用凝胶提取试剂盒纯化，然后用 Illumina MiSeq 平台进行双端测序。

使用 Qiime 2 软件对原始序列进行去除非生物核苷酸序列，如引物和接头等，然后利用 DADA2 标准流程对序列进行分析，构建扩增子序列变异体（ASV）表。通过下载的 Silva 参考数据库（https://www.arb-silva.de/）对 ASV 进行注释，并计算土壤细菌 α 多样性指数，包括香农

（Shannon）指数、丰富度数（Richness 指数）。为避免测序深度对后续分析的影响，所有的样本按最下序列数（13 553）进行抽平，以便于后期的下游分析，包括 α 和 β 多样性分析。不同柑橘年限土壤细菌 β 多样性通过 Bray-Curtis 相似矩阵（ANOSIM）进行分析，并利用 Bonferroni 对 *P* 值进行校正，比较不同柑橘年限土壤细菌群落的结构差异性。在 R 4.3.1 中利用 vegan 包对土壤细菌群落组成通过 Bray-Curtis 距离进行主坐标分析（PCoA），第一轴的特征向量用于表征土壤细菌群落结构（PCoA1）。

微生物共现网络是基于 WGCNA 包构建斯皮尔曼（Spearman）相关矩阵获得的[15]。为避免低丰度 ASV 对微生物网络的影响，采用相对丰度大于 0.01%的 ASV 进行微生物共现网络构建。在网络图中，ASV 代表节点，而 ASV 之间的相关性用边表示。微生物网络属性是通过使用 igraph 包获得。每个样本的网络拓扑特征通过提取每个样点的子网络获得，然后计算其每个子网络的拓扑特征。结合细菌网络的拓扑特征识别关键 ASV，使用 Gephi 0.10 对不同柑橘年限土壤细菌的共现网络进行可视化。基于微生物分类信息，利用 FAPROTAX 数据库预测不同柑橘年限下土壤细菌的潜在功能[16]。

模块（Module）是指多个 ASV（共现网络图中的节点）在组内高度连接但与组外连接较少。模块间连通度（Pi）和模块内连通度（Zi）用于确定每个节点的连接性，代表它们在网络中的拓扑角色。Zi 越大表明该节点在模块中的作用越大，Pi 越高表明其与其他模块的关系越紧密。根据 Zi 和 Pi，将节点分为四种不同的角色：模块中心点（Module hubs）（Zi＞2.5 且 Pi ≤ 0.62；模块内连接度高的节点）、网络枢纽（Network hubs）（Zi＞2.5 且 Pi＞0.62）、连接器（Connectors）（Zi ≤ 2.5 且 Pi＞0.62；连接模块的节点）以及外围节点（Peripherals）（Zi ≤2.5 且 Pi ≤0.62）。通常，充当连接器（Connectors）、网络枢纽（Network hubs）和模块中心点（Module hubs）的 ASV 被认为是关键微生物类群（Keystone taxa）。

1.5 数据统计分析

生态系统多功能性可同时量化多个生态系统过程和功能，其中包括养分循环（例如养分可用性、矿化）和有机物分解（例如木质素、纤维素降解）。土壤 SOM、NO_3^--N、NH_4^+-N、$CaCl_2$-P、Citrate-P、HCl-P、AP、CBH、NAG、BG 和 ALP 很好地代表了土壤养分循环和有机质降解过程[17]。氮和磷是限制陆地生态系统初级生产力的主要元素，例如，铵态氮和硝态氮是微生物和植物生长繁殖的重要氮源。为获得每个地点的多功能指数，首先将每一个变量使用 Z 分数变换进行归一化（根据需要进行对数变换）和标准化。然后，对每种土壤功能指标的 Z 分数进行平均，以获得每个样品的多功能性指数，包括碳循环多功能指数（CMF）、氮循环多功能指数（NMF）和磷循环多功能指数（PMF）。多功能指数广泛应用于生态系统多功能性研究[18]。

利用 SPSS 26.0 进行单因素方差分析，比较不同多功能性指数、土壤细菌多样性和土壤基本理化性质在不同柑橘年限之间的差异性。同时，进行皮尔森（Pearson）相关性分析，探讨土壤细菌多样性与土壤特性之间的关系。利用线性回归揭示土壤多功能性与细菌群落多样性、微生物网络中的边数和节点数之间的关系。利用方差分解（VPA）分析土壤 pH、细菌群落多样性和细菌网络复杂性对土壤多功能性的影响。

2 结 果

2.1 不同柑橘种植年限土壤碳氮磷循环相关的多功能性指数变化特征

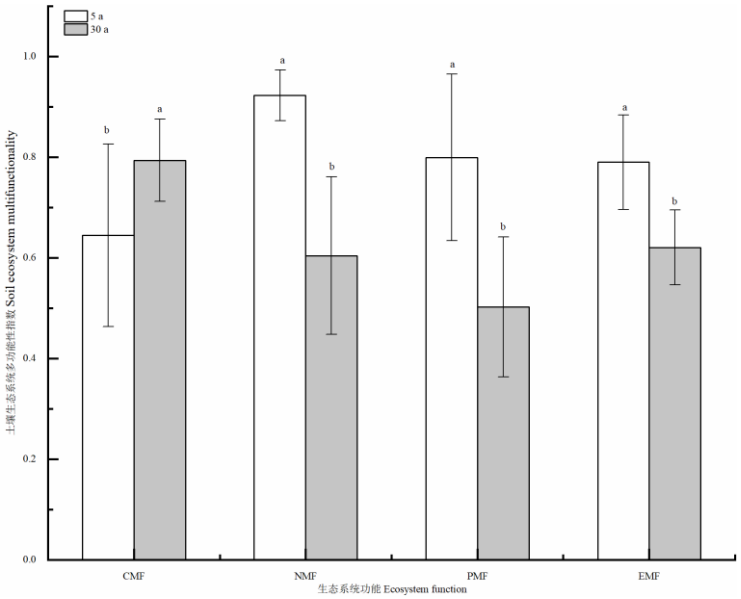
长期集约化柑橘种植导致了土壤 SOM、硝态氮、铵态氮及不同形态磷的积累，同时也加剧了土壤酸化（表 1）。基于平均值法，计算了与碳、氮、磷循环相关的多功能性指数。柑橘种植显著改变了土壤的多功能性。具体而言，随着柑橘种植年限的增加，土壤 CMF 呈现增加趋势，即 5 a＜30 a（P<0.05）；而土壤 NMF 和 PMF 则呈现下降趋势，即 5 a＞30 a（P<0.05）。土壤总的多功能性指数（EMF）与 NMF、PMF 的变化趋势一致，随着柑橘种植年限增加而降低。上述结果表明，柑橘种植对不同生态功能的影响存在显著差异（图 1）。

表 1 不同柑橘种植年限土壤理化性质

Table 1 Soil physical and chemical properties under different citrus planting years

种植年限 Planting year/a	SOM/ (g·kg^{-1})	NO_3^--N / (mg·kg^{-1})	NH_4^+-N / (mg·kg^{-1})	AP / (mg·kg^{-1})	HCl-P / (mg·kg^{-1})	Citrate-P / (mg·kg^{-1})	$CaCl_2$-P / (mg·kg^{-1})	pH
5	17.95±6.65b	37.36±36.09b	4.56±2.46b	31.40±21.16b	554.3±406.8b	217.0±242.8b	5.00±3.83b	5.75±0.75a
30	20.86±4.72a	117.3±60.53a	58.96±41.99a	108.6±26.50a	801.9±212.4a	331.1±89.93a	28.44±13.95a	3.69±0.37b

注：数据为 21 个样地的平均值±标准误。SOM，土壤有机质；NO_3^--N，土壤硝态氮；NH_4^+-N，土壤铵态氮；AP，土壤有效磷；HCl-P，矿物结合态磷；Citrate-P，有机酸态磷；$CaCl_2$-P，可交换态磷。同列不同小写字母表示差异显著。下同。Note: The data represent the mean ± standard error of 21 sample plots. SOM, soil organic matter; NO_3^--N, soil nitrate nitrogen; NH_4^+-N, soil ammonium nitrogen; AP, soil available phosphorus; HCl-P, mineral-bound phosphorus; Citrate-P, organic acid-bound phosphorus; $CaCl_2$-P, exchangeable phosphorus. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences. The same as below.



注：不同小写字母表示相同指标不同年限间差异显著。CMF，碳循环多功能性；NMF，氮循环多功能性；PMF，磷循环多功能性；EMF，土壤生态系统多功能性。下同。Note: Different lowercase letters indicate significant differences in the same index among different years. CMF, carbon cycle multifunctionality; NMF, nitrogen cycle multifunctionality; PMF, phosphorus cycle multifunctionality; EMF, soil ecosystem multifunctionality. The same as below.

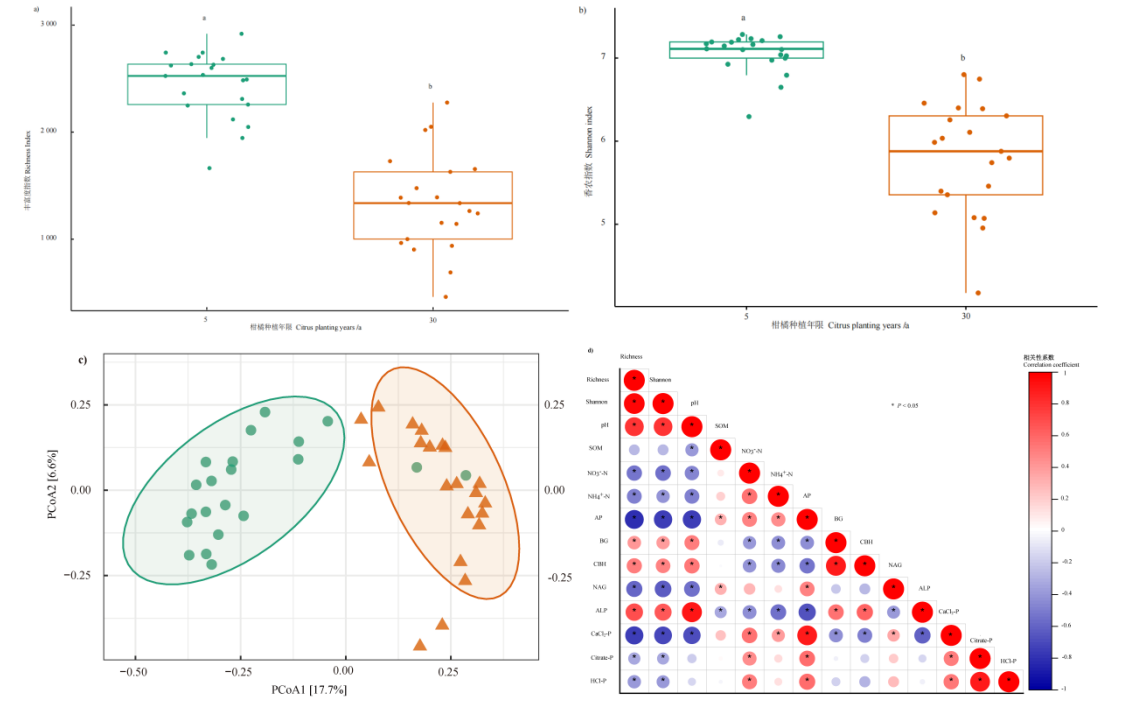
图 1 不同柑橘种植年限土壤生态系统多功能性指数

Fig. 1 Soil ecosystem multifunctionality under different citrus planting years

2.2 不同柑橘种植年限土壤细菌群落多样性及群落结构特征

长时间的柑橘种植导致土壤细菌多样性显著下降，种植 30 a 的柑橘土壤丰富度和香农指数显著低于种植 5 a 的柑橘土壤（图 2a，图 2b）。土壤细菌的香农指数从 5 a 的 7.05 下降至 30 a 的 5.79，丰富度指数则从 2 441 降至 1 335。此外，土壤细菌多样性与大多数土壤特性（如 pH、BG、CBH、ALP）呈显著正相关，而与土壤 NAG、硝态氮、铵态氮、有效磷、HCl-P、Citrate-P 和 $CaCl_2$-P 则呈显著负相关（$P<0.05$）（图 2d）。因此，长时间柑橘种植导致土壤细菌多样性的丧失，会引起土壤生态系统功能的下降。

不同柑橘种植年限的土壤细菌群落结构存在明显差异。基于 Bray-Curtis 相似矩阵进行的 ANOSIM 分析表明，5 a 柑橘与 30 a 柑橘之间存在显著差异（$P<0.001$）。主坐标分析（PCoA）进一步表明，土壤细菌群落根据柑橘种植年限发生了显著聚集，分布在 x 轴的两侧（图 2c）。



注： Richness，丰富度指数；Shannon，香农指数；BG，β-1,4-葡萄糖苷酶；CBH，纤维二糖水解酶；NAG，包括 β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶；ALP，碱性磷酸酶；PCoA，主坐标分析。下同。Note: Richness, Richness index; Shannon, Shannon index; BG, β-1,4-glucosidase; CBH, cellobiose hydrolase; NAG, β-N-acetylglucosaminidase; ALP, alkaline phosphatase; PCoA, principal coordinate analysis.. The same as below.

图 2 不同柑橘种植年限土壤细菌群落多样性（a. 丰富度指数，b.香农指数）与结构特征（c）及细菌群落多样性与土壤基本特性的相关性（d）

Fig. 2 Diversity (a. Richness index, b. Shannon index) and structural characteristics (c) of soil bacterial communities under different citrus planting years, and correlation analysis between bacterial community diversity and basic soil properties (d)

不同柑橘种植年限的土壤细菌群落主要由变形菌门、放线菌门、酸杆菌门、绿弯菌门和芽单胞菌门组成，其平均相对丰度约占总体的 91.7%（图 3）。随着柑橘种植年限的增加，放线菌门、变形菌门和厚壁菌门的相对丰度显著增加，而酸杆菌门、绿弯菌门和芽单胞菌门的相对丰度显著下降。种植年限 30 a 土壤的细菌群落更加聚集，主要以放线菌门和变形菌门为主，其相对丰度分别为 49.2%和 31.3%，而其他细菌门的相对丰度较低。

本研究利用原核类群功能注释（FAPROTAX）数据库对土壤细菌群落进行了功能组分类，特别关注参与土壤氮循环的类群。氮固定（Nitrogen fixation）、硝化（Nitrification）、好氧氨氧化（Aerobic ammonia oxidation）、反硝化（Denitrification）、好氧亚硝酸氧化（Aerobic nitrite oxidation）细菌的相对丰度均表现为：5 a>30 a。相比之下，参与亚硝酸氨化过程（Nitrite ammonification）的细菌相对丰度并未受到柑橘种植年限的影响（图 3）。

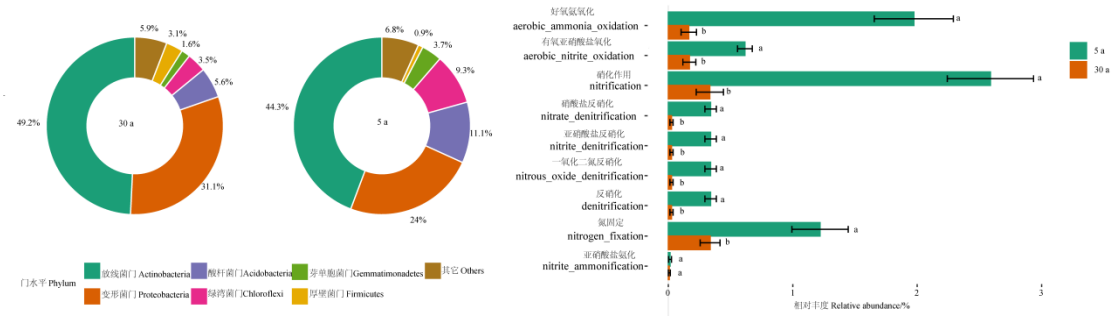
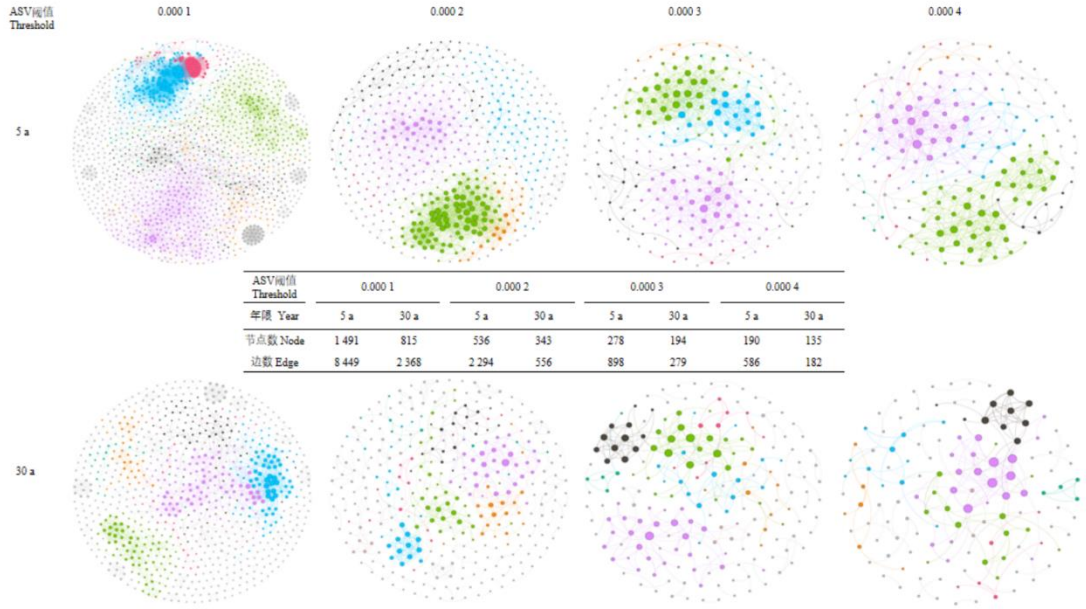


图 3 不同柑橘种植年限土壤细菌群落组成及功能特征

Fig. 3 Composition and functional characteristics of soil bacterial communities under different citrus planting years

2.3 不同柑橘种植年限土壤细菌群落网络复杂性及稳定性

不同柑橘种植年限的土壤细菌群落网络均表现出不同的共现模式（图 4）。通过节点、边数等网络拓扑参数来评估土壤微生物网络的复杂性，节点数和边数越高，代表网络复杂性越高。在这两个柑橘种植年限土壤中，低柑橘种植年限土壤中的节点数和边数均高于高年限土壤。上述结果表明柑橘种植年限降低土壤细菌群落网络的复杂性。不同 ASV 阈值下，土壤微生物的网络复杂性呈现明显差异，但微生物网络复杂性均表现为：5 a＞30 a，而且阈值越高，土壤微生物网络复杂性越低，不同柑橘种植年限之间的差异也越小。因此，主要针对相对丰度大于 0.000 1 的 ASV 进行微生物网络分析，分析其网络拓扑特征对土壤生态系统多功能性的影响。



ASV阈值 Threshold	0.000 1		0.000 2		0.000 3		0.000 4	
年限 Year	5 a	30 a	5 a	30 a	5 a	30 a	5 a	30 a
节点数 Node	1 491	815	536	343	278	194	190	135
边数 Edge	8 449	2 368	2 294	556	898	279	586	182

注：不同颜色表示不同模块。Note: Different color represented different module.

图 4 不同扩增子序列变异体(ASV)阈值下柑橘土壤细菌网络特征

Fig. 4 Characteristics of citrus soil bacterial networks at different amplicon sequence variant (ASV) thresholds

通过计算不同柑橘种植年限土壤的微生物分子生态网络的模块间连通度（Pi）和模块内连通度（Zi）（图 5），发现 5 a 和 30 a 柑橘土壤微生物网络中的绝大数节点属于外围节点（Peripherals）（Zi≤2.5，Pi≤0.62）。种植年限 5 a 和 30 a 土壤细菌的物种节点分布之间均无连接网络枢纽（Network hubs）（Zi>2.5，Pi>0.62）。种植 30 a 的柑橘土壤微生物网络中仅有一个模块枢纽（Module hubs）（Zi>2.5，Pi≤0.62），属于放线菌门，其余均为外围节点，而种植 5 a 的柑橘土壤微生物生态网络包 33 个模块枢纽，分属于放线菌门、变形菌门和绿弯菌门。此外，种植 5 a 的柑橘土壤微生物网络中有 6 个连接器，分属于放线菌门（5 个）和绿弯菌门（1 个）（表 2）。

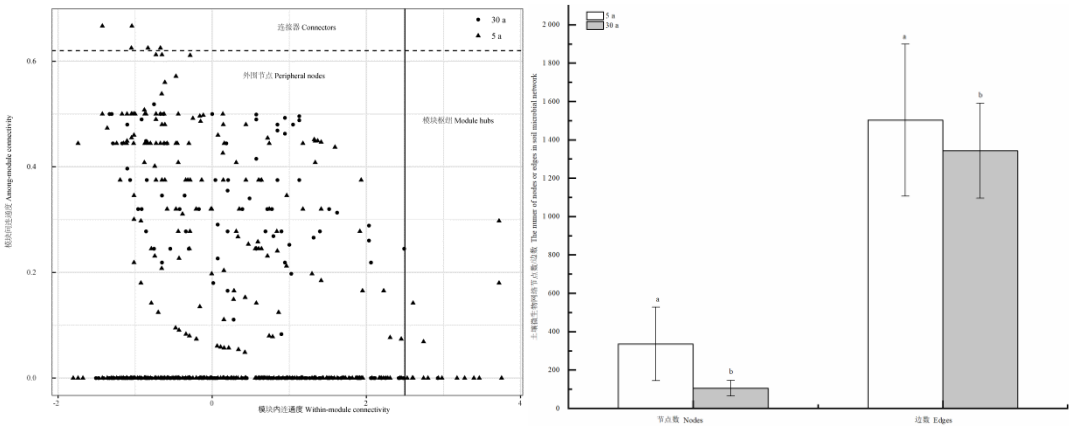


图 5 不同柑橘种植年限土壤细菌网络拓展特征

Fig. 5 Characteristics of soil bacterial networks under different citrus planting years

表 2 不同柑橘种植年限土壤微生物网络中关键 ASVs

Table 2 Key amplicon sequence variants in soil microbial networks under different citrus planting years

种植年限 Planting year/a	物种 Species	模块 Module	节点类别 Node category	门 Phylum	纲 Class	目 Order
5	ASV_199511	M2	连接器	放线菌门	放线菌纲	弗兰克氏菌目
	ASV_105738	M4	连接器	放线菌门	放线菌纲	链霉菌目
	ASV_160397	M5	连接器	放线菌门	放线菌纲	丙酸杆菌目
	ASV_190644	M8	连接器	放线菌门	0319-7L14	0319-7L14
	ASV_104561	M7	连接器	绿弯菌门	厌氧绳菌纲	厌氧绳菌目
	ASV_51353	M4	模块中心点	放线菌门	放线菌纲	链霉菌目
	ASV_114447	M2	模块中心点	放线菌门	放线菌纲	弗兰克氏菌目
	ASV_161122	M4	模块中心点	放线菌门	放线菌纲	丙酸杆菌目
	ASV_20155	M2	模块中心点	放线菌门	放线菌纲	丙酸杆菌目
	ASV_211832	M5	模块中心点	放线菌门	嗜热油菌纲	Gaiellales
	ASV_284400	M1	模块中心点	放线菌门	放线菌纲	弗兰克氏菌目
	ASV_62639	M2	模块中心点	放线菌门	放线菌纲	棒杆菌目
	ASV_273918	M2	模块中心点	放线菌门	放线菌纲	微球菌目
	ASV_43628	M2	模块中心点	放线菌门	放线菌纲	丙酸杆菌目
	ASV_137716	M2	模块中心点	放线菌门	嗜热油菌纲	红色土杆菌目
	ASV_197051	M1	模块中心点	放线菌门	嗜热油菌纲	红色土杆菌目
	ASV_56767	M4	模块中心点	放线菌门	嗜热油菌纲	Gaiellales
	ASV_43136	M2	模块中心点	放线菌门	放线菌纲	弗兰克氏菌目
	ASV_296976	M4	模块中心点	放线菌门	嗜热油菌纲	红色土杆菌目
	ASV_268212	M1	模块中心点	放线菌门	嗜热油菌纲	红色土杆菌目
	ASV_113643	M1	模块中心点	放线菌门	放线菌纲	棒杆菌目
	ASV_116756	M1	模块中心点	放线菌门	嗜热油菌纲	红色土杆菌目
	ASV_34059	M1	模块中心点	放线菌门	放线菌纲	丙酸杆菌目
	ASV_9225	M1	模块中心点	放线菌门	嗜热油菌纲	Gaiellales
	ASV_221816	M2	模块中心点	放线菌门	嗜热油菌纲	红色土杆菌目
	ASV_31228	M2	模块中心点	放线菌门	放线菌纲	棒杆菌目
	ASV_282540	M4	模块中心点	放线菌门	嗜热油菌纲	红色土杆菌目
	ASV_251626	M1	模块中心点	放线菌门	酸微菌纲	海放线菌目
	ASV_62775	M5	模块中心点	绿弯菌门	KD4-96	KD4-96
	ASV_11214	M2	模块中心点	绿弯菌门	KD4-96	KD4-96
	ASV_137812	M1	模块中心点	绿弯菌门	Gitt-GS-136	Gitt-GS-136

	ASV_272156	M5	模块中心点	绿弯菌门	纤线杆菌纲	C0119
	ASV_98646	M10	模块中心点	芽单胞菌门	芽单胞菌纲	芽单胞菌目
	ASV_286846	M1	模块中心点	变形菌门	α-变形菌纲	固氮螺菌目
	ASV_142295	M2	模块中心点	变形菌门	α-变形菌纲	根瘤菌目
	ASV_277632	M1	模块中心点	变形菌门	α-变形菌纲	固氮螺菌目
	ASV_212922	M2	模块中心点	变形菌门	芽单胞菌纲	黄单胞菌目
	ASV_282504	M7	模块中心点	变形菌门	芽单胞菌纲	β-变形菌目
30	ASV_278668	M4	模块中心点	放线菌门	嗜热油菌纲	红色土杆菌目

2.4 土壤细菌多样性、网络拓扑特征与多功能性指数的耦合机制

土壤细菌多样性与土壤多功能性存在显著相关性，不同功能呈现不同的变异趋势（图 6）。土壤香农指数与 CMF 呈显著负相关（$P<0.05$），与 NMF、PMF 呈显著正相关（$P<0.001$），表明土壤细菌多样性丧失会影响部分生态功能的发挥，如 NMF 和 PMF。土壤细菌网络节点数和边数与土壤多功能性呈相似的变异趋势，与 CMF 呈显著负相关（$P<0.01$），与 NMF 呈显著正相关（$P<0.01$）。土壤细菌网络边数与 PMF 相关性不显著（$P>0.05$）。

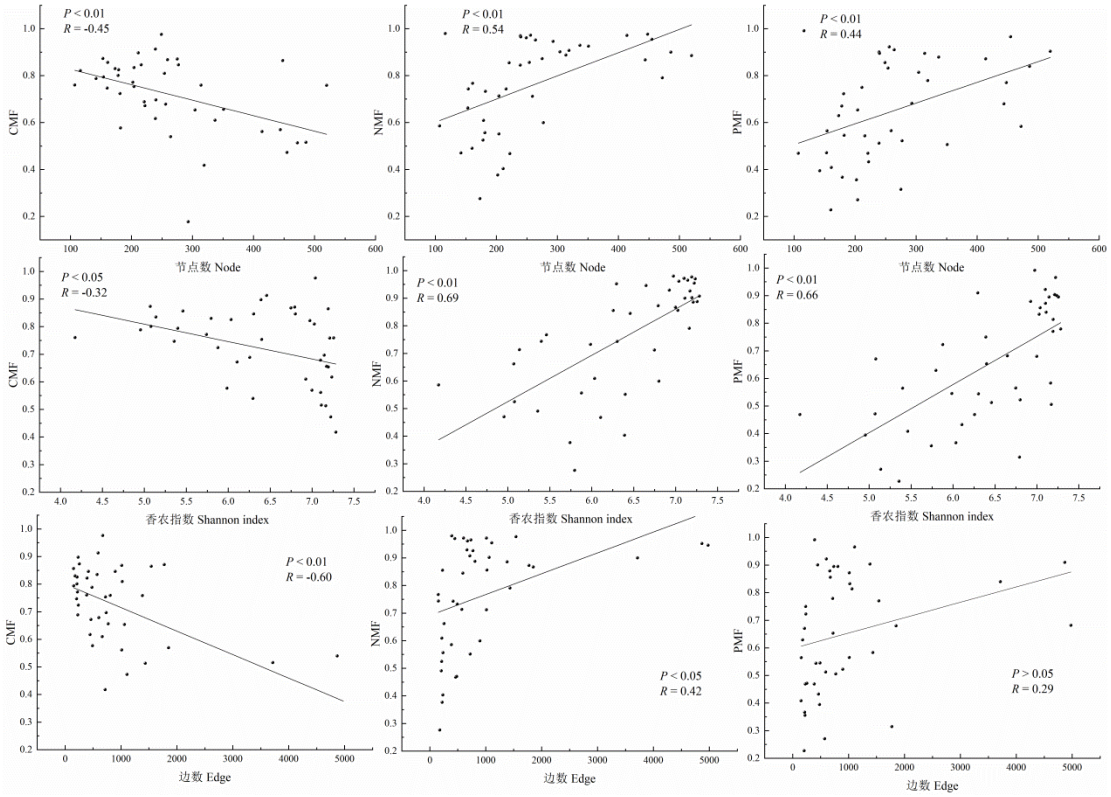


图 6 土壤细菌多样性、网络复杂性与土壤生态系统多功能性之间的耦合关系

Fig. 6 Coupling relationship between soil bacterial diversity, network complexity, and soil ecosystem multifunctionality

土壤 pH 解释了土壤生态系统多功能性组成变化的 0.5%，土壤细菌 α-和 β-多样性共同解释了土壤生态系统多功能性组成变化的 13.1%，土壤微生物网络复杂性解释了土壤生态系统多功能性组成变化的 11.1%，这三组变量组共同解释了土壤生态系统多功能性组成变化的 21.8%，还有 51.8%未被解释，主要是一些未观察到的变量（图 7）。

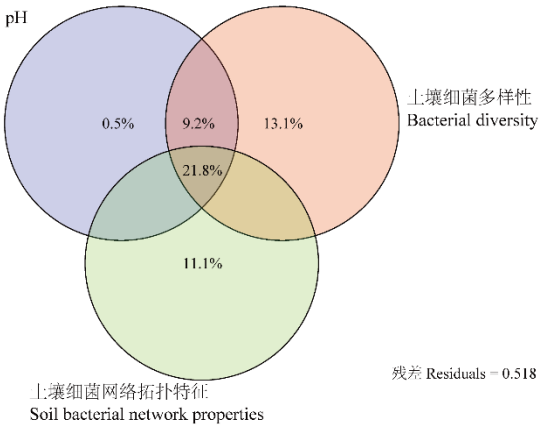


图 7 方差分解分析（VPA）不同环境因子对土壤生态系统多功能性的影响

Fig. 7 Variance partitioning analysis (VPA) of the effects of different environmental factors on soil ecosystem multifunctionality

3 讨 论

3.1 集约化强度降低了微生物多样性和土壤多功能性

本研究发现土壤生态系统多功能性随着柑橘种植年限的增加发生显著变化（图 1），这表明人类活动高度干扰的集约化种植会导致多种生态系统功能的减弱。该结果与自然生态系统存在显著差异，次生演替促进亚热带森林多种生态系统功能的有效恢复[6]。本研究中，与种植 5 a 的柑橘土壤相比，30 a 的柑橘种植导致土壤 NMF 和 PMF 降低，而 CMF 则增加（图 1）。随着黄土高原造林时间的增加，土壤微生物多样性和生态系统多功能性均呈现出先显著增加后下降的趋势，其生态系统多功能性在造林恢复的第 20 年达到最大值[19]。与本研究结果（图 1）相比，自然生态系统恢复，如植被演替和人工造林均有助提高土壤生态系统多功能性[19]。此外，多功能性指数随时间的增长可能不一定是线性的，因为生态系统多功能性需要几十年的时间才能转向下一个演替阶段[20]。本研究中，仅涉及了两个年限，以观察和比较短期和长期耕作活动对土壤生态系统影响的累积效应，但未关注到土壤多功能性变异的动态过程。

以往的研究表明，生态系统多功能性总是与土壤微生物多样性呈显著正相关[21]，微生物多样性在维持生态系统多功能性的稳定方面发挥重要作用。本研究中，细菌多样性与碳循环相关的多功能性指数呈显著负相关，与氮磷循环相关的多功能性指数呈显著正相关（图 6）。在柑橘土壤中，细菌多样性与不同生态功能之间耦合关系存在相异性，主要是由于柑橘种植体系中存在较大强度的人为干扰，导致土壤养分库的来源与自然生态系统中较大差异。高强度的化肥施用不仅会改变土壤微生物对养分的利用率，也会直接增加土壤养分的有效性。据统计，全球农业土壤接近 1/2 的磷来自于施肥[22]。因此，在农业土壤中很难排除施肥对土壤养分的影响，在应用土壤有效态氮磷进行表征生态系统多功能性时需慎重考虑。

集约化种植是现代农业主要发展态势，自 20 世纪 50 年代以来，世界农业一直依赖于矿物质化肥的大量使用[23]。农业土壤有效磷近半源于人为活动输入[22]。高强度的化肥投入，导致土壤无机磷含量逐年累积，种植 30 a 的柑橘土壤有效磷含量显著高于种植 5 a 的柑橘土壤（表 1）。长时间的柑橘种植也促进了其他形态无机磷的累积，包括可交换态磷、矿物结合态磷[24]，同时也会引起磷流失风险，引发水体富营养化等水环境问题。柑橘土壤无机磷含量高度累积，表明其对矿物质磷肥的强烈依赖，未来应考虑对土壤无机磷的活化利用，而不是一味地增加磷肥投入以维持柑橘高产稳产。

长期高强度集约化柑橘种植也会引起土壤酸化，30 a 柑橘土壤 pH 显著低于 5 a 柑橘（表

1），直接降低土壤细菌群落多样性。土壤细菌具有较窄的最适 pH 范围，土壤 pH 的降低对细菌群落组成和丰度具有显著影响[25]。因此，30 a 柑橘土壤细菌群落多样性和组成均显著区别于 5 a 柑橘土壤（图 2）。此外，土壤高氮磷累积也会影响土壤细菌的生活史策略发生改变。

酸杆菌门被视为 K-策略（寡营养型）细菌，主要分解半纤维素或纤维素等难降解有机物[26-27]，而绿弯菌门（Chloroflexi）的生长速度非常缓慢[28]，主要分布在在营养贫乏的环境中[29]，如本研究中种植 5 a 的柑橘土壤，其相对丰度显著高于种植 30 a 的柑橘土壤（图 3）。β-和 γ-变形菌是快速生长的嗜营养细菌（r-策略），主要以不稳定的有机底物为食，其主要分布在营养丰富的环境中[30]。厚壁菌门能够分泌降解新鲜有机物的酶，低亲和力转运蛋白的存在允许在高营养条件下快速生长，而在饥饿条件下缓慢生长[31]，这也解释了这些富营养型细菌群在高柑橘年限土壤中的相对丰度显著高于低柑橘年限土壤（图 3）。

3.2 集约化强度改变土壤细菌组成和网络复杂性

本研究结果对于了解柑橘种植年限对土壤细菌群落结构和功能的影响具有重要意义。柑橘种植年限的增加导致土壤细菌群落的多样性和复杂性下降（图 4）。土壤微生物通过促进有机质分解和养分循环，改变土壤中资源可利用性，影响土壤多种生态功能（多功能性）。本研究土壤细菌的群落多样性和网络复杂性的变化与柑橘种植引起的土壤养分变化之间存在紧密关联（图 6），表明土壤细菌在维持土壤多功能性方面具有重要作用。由于多样化和复杂的微生物群落较单一的微生物群落更能适应环境压力[32]，自然存在的微生物组在持续压力下表现出不稳定群落的网络特征[33]。长时间的柑橘种植导致的微生物多样性和复杂性下降可能会对土壤多种功能产生长期的不利影响。因此，长时间高强度柑橘种植导致土壤多功能性、微生物多样性和复杂性的损失共同引起土壤退化并损害土壤提供的各项生态系统功能。因此，高强度集约化柑橘种植导致的退化土壤恢复应考虑土壤微生物多样性及网络复杂性。

微生物网络分析是基于不同 ASV 之间的相关性，但是这种相关性是否真实存在尚未验证。因此使用微生物网络分析需慎重，尤其是在低阈值下，由于大量零值和低丰度 ASV 会导致显著的相关性。本研究中发现，阈值越低土壤微生物网络越复杂，但是不同柑橘年限土壤微生物网络差异在不同阈值下均呈现相同趋势（图 4）。不同柑橘年限土壤中的关键物种也存在明显差异，30 a 柑橘土壤中仅有一个关键物种，而种植 5 a 的柑橘土壤含有 39 个关键物种（表 2），而且这些关键物种多样性也与土壤多功能性（NMF 和 PMF）呈显著相关（图 6），但是这种作用均是基于相关性，并未直接检验上述关键物种的调节作用，因此后续的研究需验证这些关键物种在柑橘种植过程中的作用，以及对土壤多功能性的影响机制。

本研究基于微生物生态学网络证实了微生物网络复杂性与土壤多功能性之间的相关性，表明土壤微生物多样性丧失可能会降低部分生态功能，也会刺激其他生态功能（如 CMF）的发挥，证实了土壤微生物在土壤生态功能发挥方面存在差异。此外，土壤 pH 也是影响柑橘土壤多功能性变化的重要因素。一方面，土壤 pH 直接影响土壤微生物群落的组成及活性，进而影响微生物对有机质降解和养分循环等重要生态过程。土壤有机质的降解速率和氮磷养分的有效性也与 pH 有关，如 pH 直接影响土壤胞外酶活性，不同的酶活性具有不同最适 pH 范围[34]。利用方差分解将土壤 pH 纳入对 EMF 的影响后发现，土壤微生物网络复杂性和微生物多样性对 EMF 变化的解释度远高于土壤 pH 对 EMF 变化的解释度（图 7）。因此，土壤微生物多样性和网络复杂性共同驱动了柑橘土壤 EMF 的变化。

4 结 论

本研究证实柑橘种植年限对土壤细菌具有深远的影响，特别是显著改变了微生物的生活史策略，导致土壤细菌由寡营养型（K-策略）向富营养型（r-策略）转变，减少了酸杆菌门和绿弯菌门等优势菌的相对丰度。微生物生态网络分析表明，柑橘种植年限显著改变了微生物共现网络的稳定性和复杂性。长时间高强度柑橘种植引起的土壤细菌多样性与土壤多功能性密切相关；特别是细菌网络节点数、边数和关键物种丰度对土壤多种功能具有重要调节作用。土壤细菌群落多样性丧失和微生物网络复杂性减低是引起土壤多功能性发生改变的主导因子。总体而言，本研究结果为高强度集约化种系统中土壤细菌群落对土壤不同生态功能的预测与调控提供

了新的视角。

参考文献（References）

[1] Lefcheck J S, Byrnes J E K, Isbell F, et al. Biodiversity enhances ecosystem multifunctionality across trophic levels and habitats[J]. Nature Communications, 2015, 6: 6936.
[2] Wagg C, Bender S F, Widmer F, et al. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(14): 5266-5270.
[3] Delgado-Baquerizo M, Maestre F T, Reich P B, et al. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems[J]. Nature Communications, 2016, 7(1): 10541.
[4] Miki T, Yokokawa T, Matsui K. Biodiversity and multifunctionality in a microbial community: A novel theoretical approach to quantify functional redundancy[J]. Proceedings Biological Sciences, 2014, 281(1776): 20132498.
[5] Yang Y, Chai Y B, Xie H J, et al. Responses of soil microbial diversity, network complexity and multifunctionality to three land-use changes[J]. Science of the Total Environment, 2023, 859: 160255.
[6] Shi X Z, Wang J Q, Lucas-Borja M E, et al. Microbial diversity regulates ecosystem multifunctionality during natural secondary succession[J]. Journal of Applied Ecology, 2021, 58(12): 2833-2842.
[7] Li Y Z, Zhang J Z, Jia J Y, et al. Research progresses on farmland soil ecosystem multifunctionality[J]. Acta Pedologica Sinica,2022,59(5):1177-1189. [李奕赞, 张江周, 贾吉玉, 等. 农田土壤生态系统多功能性研究进展[J]. 土壤学报, 2022, 59(5): 1177-1189.]
[8] Bahram M, Hildebrand F, Forslund S K, et al. Structure and function of the global topsoil microbiome[J]. Nature, 2018, 560(7717): 233-237.
[9] Zeng Q C, Mei T, Wang M X, et al. Intensive citrus plantations suppress the microbial profiles of the β-glucosidase gene[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2022, 323: 107687.
[10] Bao S D. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000. [鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000.]
[11] Zhou L H, Zeng Q C, Mei T Y Z, et al., Intensive citrus cultivation suppresses soil phosphorus cycling microbial activity[J]. Environmental Science, 2024, 45(5): 2881-2890. [周连昊, 曾全超, 梅唐英泽, 等. 集约化柑橘种植抑制土壤磷循环微生物活性[J]. 环境科学, 2024. 45(5): 2881-2890.]
[12] Wei X M, Hu Y J, Razavi B S, et al. Rare taxa of alkaline phosphomonoesterase-harboring microorganisms mediate soil phosphorus mineralization[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2019, 131: 62-70.
[13] Bell C W, Fricks B E, Rocca J D, et al. High-throughput fluorometric measurement of potential soil extracellular enzyme activities[J]. Journal of Visualized Experiments, 2013(81): e50961.
[14] Zeng Q C, Chen Z, Tan W F. Plant litter quality regulates soil eco-enzymatic stoichiometry and microbial nutrient limitation in a citrus orchard[J]. Plant and Soil, 2021, 466(1): 179-191.
[15] Liu C, Cui Y M, Li X Z, et al. Microeco: An R package for data mining in microbial community ecology[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2021, 97(2): fiaa255.
[16] Louca S, Parfrey L W, Doebeli M. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome[J]. Science, 2016, 353(6305): 1272-1277.
[17] Maestre F T, Quero J L, Gotelli N J, et al. Plant species richness and ecosystem multifunctionality in global drylands[J]. Science, 2012, 335(6065): 214-218.
[18] Wang X Y, Hou Y J, Li H X, et al. Network complexity and community composition of key bacterial functional groups promote ecosystem multifunctionality in three temperate steppes of Inner Mongolia[J]. Plant and Soil, 2024, 494(1): 251-268.
[19] Dong Z H, Zhang J H, He J, et al. Prediction of soil microbial network complexity for restoration of ecosystem multifunctional by afforestation in Loess Plateau[J]. Acta Ecologica Sinica, 2024, 44(6): 2544-2560. [董政宏, 张君红, 何佳, 等. 土壤微生物网络复杂性预测黄土高原造林恢复生态系统多功能性[J]. 生态学报, 2024, 44(6): 2544-2560.]
[20] Lucas-Borja M E, Delgado-Baquerizo M. Plant diversity and soil stoichiometry regulates the changes in multifunctionality during pine temperate forest secondary succession[J]. Science of the Total Environment, 2019, 697: 134204.
[21] Qiu L P, Zhang Q, Zhu H S, et al. Erosion reduces soil microbial diversity, network complexity and multifunctionality[J]. The ISME Journal, 2021, 15(8): 2474-2489.
[22] Demay J, Ringeval B, Pellerin S, et al. Half of global agricultural soil phosphorus fertility derived from anthropogenic sources[J]. Nature Geoscience, 2023, 16(1): 69-74.
[23] Coomes O T, Barham B L, MacDonald G K, et al. Leveraging total factor productivity growth for sustainable and resilient farming[J]. Nature Sustainability, 2019, 2(1): 22-28.
[24] Chen X H, Yan X J, Wang M K, et al. Long-term excessive phosphorus fertilization alters soil phosphorus fractions in the acidic soil of pomelo orchards[J]. Soil and Tillage Research, 2022, 215: 105214.
[25] Zeng Q C, An S S, Liu Y, et al. Biogeography and the driving factors affecting forest soil bacteria in an arid area[J]. Science of the Total Environment, 2019, 680: 124-131.
[26] Ali R S, Poll C, Kandeler E. Dynamics of soil respiration and microbial communities: Interactive controls of temperature and substrate quality[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2018, 127: 60-70.
[27] Razanamalala K, Razafimbelo T, Maron P A, et al. Soil microbial diversity drives the priming effect along climate gradients: A case study in Madagascar[J]. The ISME Journal, 2018, 12(2): 451-462.
[28] Davis K E R, Sangwan P, Janssen P H. Acidobacteria, Rubrobacteridae and Chloroflexi are abundant among very slow-growing and mini-colony-forming soil bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(3): 798-805.
[29] Will C, Thürmer A, Wollherr A, et al. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(20): 6751-6759.
[30] Fierer N, Bradford M A, Jackson R B. Toward an ecological classification of soil bacteria[J]. Ecology, 2007, 88(6): 1354-1364.
[31] Li H, Zhang Y Y, Yang S, et al. Variations in soil bacterial taxonomic profiles and putative functions in response to straw incorporation combined with N fertilization during the maize growing season[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2019, 283: 106578.
[32] Li M, Chen L D, Yang X R, et al. Community characteristic and functional variability of soil microbes in urban-rural

complex ecosystem[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021, 58(6): 1368-1380. [李敏, 陈利顶, 杨小茹, 等. 城乡复合生态系统土壤微生物群落特征及功能差异: 研究进展与展望[J]. 土壤学报, 2021, 58(6): 1368-1380.]

[33] Hernandez D J, David A S, Menges E S, et al. Environmental stress destabilizes microbial networks[J]. The ISME Journal, 2021, 15(6): 1722-1734.

[34] Wan H Y, Chen L, Pang D B, et al. Soil enzyme activities and their stoichiometry at different altitudes in Helan Mountains, Northwest China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2021, 32(9): 3045-3052. [万红云, 陈林, 庞丹波, 等. 贺兰山不同海拔土壤酶活性及其化学计量特征[J]. 应用生态学报, 2021, 32(9): 3045-3052.]

（责任编辑：陈荣府）