

DOI: 10.11766/trxb201908050402

王晓洁, 卑其成, 刘钢, 谢祖彬. 不同类型水稻土微生物群落结构特征及其影响因素[J]. 土壤学报, 2021, 58 (3): 767–776.

WANG Xiaojie, BEI Qicheng, LIU Gang, XIE Zubin. Microbial Abundance and Community Composition in Different Types of Paddy Soils in China and Their Affecting Factors[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021, 58 (3): 767–776.

不同类型水稻土微生物群落结构特征及其影响因素*

王晓洁^{1,2}, 卑其成¹, 刘 钢¹, 谢祖彬^{1†}

(1. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要: 选取基于我国土壤地理发生分类的不同类型土壤发育的四种水稻土, 利用 ¹⁵N₂ 气体示踪法测定生物固氮速率, 采用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术测定细菌丰度, 通过 16S rRNA 基因高通量测序分析微生物群落组成和多样性。结果表明: 变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 和蓝藻门 (Cyanobacteria) 是水稻土中优势微生物类群。四种类型土壤发育的水稻土细菌群落结构差异显著 (Stress<0.001), 群落结构分异 (NMDS1) 与土壤 pH 存在极显著正相关关系 (P<0.01)。土壤有机碳和碱解氮含量显著影响水稻土中细菌丰度和群落多样性 (P<0.01)。红壤发育的水稻土细菌 16S rRNA 基因拷贝数显著高于其他三种类型水稻土, 但 OTU 数量、Chao1 指数和 PD 指数均低于其他三种类型水稻土。土壤 pH 对水稻土生物固氮速率有显著影响 (P<0.01), 紫色土发育的水稻土具有最高的生物固氮速率 (3.2±0.7 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 其中优势类群细鞘丝藻属 (*Leptolyngbya*) 可能是生物固氮的主要贡献者。研究结果丰富了对水稻土微生物多样性的认识, 为通过调控土壤 pH 和微生物群落组成来提高稻田生物固氮潜力提供了理论依据。

关键词: 水稻土; 生物固氮; 微生物丰度; 微生物多样性; 微生物群落结构; 高通量测序

中图分类号: Q143; S154.36 **文献标志码:** A

Microbial Abundance and Community Composition in Different Types of Paddy Soils in China and Their Affecting Factors

WANG Xiaojie^{1,2}, BEI Qicheng¹, LIU Gang¹, XIE Zubin^{1†}

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: 【Objective】 Rice paddy soil has long been an important soil resource for farming and developed into various types under the impact of long-term anthropogenic actions. Yet, little is known about microbes in the paddy soils. To determine factors affecting soil microbial communities in the paddy soils, soil samples of four types of paddy soils (Sublayer Shajiang soil, Red soil, Black soil and Purple soil) were collected from major rice-production regions (Jiangdu of Jiangsu, Yingtan of Jiangxi, Changchun of Jilin, and Yanting of Sichun, respectively). 【Method】 To explore abundance of the soil microbial community in the soil

* 国家自然科学基金项目 (31870500, 41501273, 40871146) 和国家科技基础性工作专项 (2015FY110700) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31870500, 41501273, 40871146) and the Special Project on the Basis of National Science and Technology of China (No. 2015FY110700)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zbxie@issas.ac.cn

作者简介: 王晓洁 (1988—), 女, 江苏常熟人, 博士研究生, 主要从事土壤微生物生态学研究。E-mail: xjwang@issas.ac.cn

收稿日期: 2019-08-05; 收到修改稿日期: 2019-10-21; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2019-11-22

samples, the real-time quantitative PCR was used, and to characterize diversity and composition of the soil microbial community, the 16S rRNA genes high-throughput sequencing was performed. With the aid of the field-based $^{15}\text{N}_2$ -labeling technique, biological nitrogen fixation (BNF) rates in the four types of paddy soils were assessed. 【Result】 The number of 16S rRNA gene copies in paddy soils ranged from 1.8×10^7 to 6.7×10^9 copies·g⁻¹ dry soil. Statistical analysis shows that the number of 16S rRNA gene copies in Red soil was significantly higher than those in the other soils ($P < 0.05$). A total of 666 738 raw sequences were obtained from 12 samples with the technique of 16S rRNA genes sequencing and were normalized to 38 715 per sample for the downstream analysis. These sequences were clustered into 13 097 OTUs. Taxonomic analysis shows that the bacterial communities in the four types of paddy soils were dominantly Proteobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi and Cyanobacteria. Results show that observed OTU number and Chao 1 and PD indices of the soil bacteria were much lower in Red soil than in the other soils. Correlation analysis of abundance and diversity of soil bacterial communities and soil properties shows that 16S rRNA genes copies, observed OTU number, Chao 1 and PD indices of soil bacteria were significantly related to soil organic carbon and alkaline nitrogen content ($P < 0.01$). Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination shows that the bacterial community structures in the four types of paddy soils varied significantly (Stress < 0.001). Among the soil properties analyzed, soil pH might play a key role in determining soil bacterial community structure ($P < 0.01$). Biological N₂ fixation rate was significantly and positively related to soil pH ($P < 0.01$). The highest biological N₂ fixation rate was found in Purple soil (3.2 ± 0.7 mg·kg⁻¹·d⁻¹), and *Leptolyngbya* might be a major contributor to the BNF in Purple soil. 【Conclusion】 All the finding in this study highlight the influence of soil properties on soil microbial communities in paddy soils and suggest that regulation of soil pH and microbes might be a strategy to increase the BNF in paddy soils.

Key words: Paddy soil; Biological nitrogen fixation; Microbial abundance; Microbial diversity; Microbial community structure; High-throughput sequencing

土壤是微生物的大本营, 通常每克土壤中含有约十亿个微生物细胞。目前, 自然界中绝大多数微生物难以被分离培养, 这极大地限制了人们对环境微生物生物多样性及其功能的认识^[1-2]。近年来, 高通量测序技术的飞速发展极大地推动了人们对微生物世界的认知。

国内外学者对森林、草地、农田等不同生态系统中土壤微生物的多样性开展了广泛研究^[3-7]。大量的研究表明土壤微生物群落组成及其丰度受到多种因素的影响, 如环境的理化性质(土壤 pH、碳氮比、含水量)、地上植被类型、外界气候因素(降雨量、温度)和自然因素(海拔、纬度)^[8-13]。土地利用方式的改变、施肥方式和耕作方式的改变也会影响土壤微生物群落结构及丰度的变化^[14-18]。

水稻土是长期水稻种植并且在翻耕和水肥管理措施下形成的一类独特的土壤资源。水稻土发生、发展和发育过程, 同样也离不开土壤微生物的参与^[19]。我国是世界上最主要的稻米产区之一, 从南到北分布的水稻土类型复杂多样。根据第二次土壤普查数据统计, 我国水稻土共分为潴育、淹育、渗育、潜育、脱潜、漂洗、盐渍及咸酸水稻土 8 个亚类, 共

114 个土属。研究发现, 生活在水稻根际的土壤微生物, 有的可以通过生物固氮作用为植株提供氮素, 有的可以分泌铁载体活化铁元素, 有的可以分泌生长激素促进植物生长^[20]。因此, 了解水稻土中微生物资源状况对维持土壤的生产力具有重要的现实意义。

本研究选取基于我国土壤地理发生分类的不同类型土壤发育的四种水稻土, 利用 $^{15}\text{N}_2$ 气体示踪法测定生物固氮速率, 通过提取稻田土壤总 DNA, 借助高通量测序 Illumina Hiseq 平台, 以 16S rRNA 基因为分子标靶, 揭示四种类型水稻土中细菌群落数量、组成及多样性, 分析细菌群落结构与土壤理化性质的相关关系, 分析影响土壤细菌群落结构差异的关键因子。

1 材料与方法

1.1 供试土壤及理化性质测定

本研究供试土壤为: (1) 下位砂姜土发育的水稻土, (2) 红壤发育的水稻土, (3) 黑土发育的水稻土, (4) 紫色土发育的水稻土。于 2014 年 4 月分别在江苏江都 ($32^\circ 35' 48''\text{N}$, $119^\circ 42' 49''\text{E}$)、江西鹰潭

(28°12'28"N, 116°56'13"E)、吉林长春(44°04'16"N, 125°44'16"E)和四川盐亭(31°16'14"N, 105°28'27"E)四个省份的长期种植水稻的稻田采集耕作层土壤(0~15 cm)。风干过 2 mm 筛, 去除根系及石子等, 室温保存。土壤基本理化指标测定参照《土壤农业化学分析方法》^[21]。pH 采用酸度计法(土水比 1:5)测定, 有机碳采用重铬酸钾容量法测定, 碱解氮采用碱解扩散法测定, 有效磷采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法测定, 速效钾采用乙酸铵浸提-火焰光度计法测定。

1.2 土壤固氮菌固氮速率测定

采用同位素标记 $^{15}\text{N}_2$ 气体示踪法, 将水稻盆栽密闭于智能植物生长箱, 定量计算单位时间单位面积土壤中固氮菌固定的氮量^[22]。每个盆钵(12 cm×12 cm×20 cm)内种植 1 株水稻(武运粳 23), 装土 2.6 kg。以 4 种水稻土类型为 4 个处理, 并设置 3 份重复。42 d 后, 采集土壤样品(0~1 cm、1~2 cm、2~5 cm、5~15 cm), 取一份土样烘干后用于测定土壤全氮的含量及 ^{15}N atom% 丰度, 另一份土样于 -20℃ 保存, 用以土壤 DNA 提取。

1.3 土壤 DNA 提取

准确称取 0.5 g 鲜土样, 采用 FastDNA Spin kit for soil (MP Biomedicals, Cleveland, OH, USA) 试剂盒和 FastPrep-24 核酸提取仪 (MP Biomedicals, CA, USA), 按照操作手册提取土壤样品的 DNA。经 1% 琼脂糖凝胶电泳测定 DNA 质量, ND-1000 UV-Vis 微量紫外/可见分光光度计 (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) 测定 DNA 纯度和浓度, 然后将提取的 DNA 保存于 -20℃ 备用。

1.4 实时荧光定量 PCR

采用实时荧光定量 PCR 法在 Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR system 定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) 上测定不同类型水稻土细菌的 16S rRNA 基因拷贝数。扩增引物为细菌通用引物 341F (CCTACGGGAGGCAGCAG)/518R (ATTACCGCGGCTGCTGG), 反应体系为 16 μL , 主要包括: 模板 DNA 8 μL , 引物各 0.5 μL , SYBR Green 7 μL 。构建目的基因标准质粒, 计算目的基因拷贝数, 以 10 倍稀释法建立标准曲线。扩增程序: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 10 s; 60℃ 退火 34 s; 72℃ 延伸 45 s, 40 个循环, 并采集分析溶解曲线。实时荧

光定量 PCR 标准曲线的扩增效率为 93.0%, $R^2=0.99$ 。

1.5 16S rRNA 基因的高通量测序

利用细菌通用引物 341F (CCTACGGGAGGCAGCAG)/518R (ATTACCGCGGCTGCTGG) 对样品 DNA 的 16S rRNA 的 V3 区域进行扩增, 扩增条件: 95℃, 3 min; 25 循环×(95℃, 30 s; 55℃, 30 s; 72℃, 30 s); 72℃, 5 min; 在 4℃ 下保存, 进行普通 PCR 扩增。将 PCR 产物用磁珠 AMPure XP beads (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA, USA) 纯化后进行加 Nextera XT Index 测序标签的普通 PCR 扩增, 扩增条件: 95℃, 3 min; 8 循环×(95℃, 30 s; 55℃, 30 s; 72℃, 30 s); 72℃, 5 min; 在 4℃ 下保存, PCR 产物再次用磁珠纯化, 将构建好的每个 DNA 样品的文库按照 DNA 定量试剂盒 Qubit dsDNA HS Assay Kit 说明书在荧光定量仪 (Qubit 2.0 Fluorometer) 上测定浓度, 均一化后等体积混合, 将混合好的文库在 2% 普通琼脂糖凝胶上电泳, 电压 120 V, 电泳 60 min。在紫外透射仪上用刀片将相应的目标片段切割下来, 利用胶回收试剂盒 (Qiagen MinElute Gel Extraction Kit) 进行回收纯化。最终构建好的文库在 Illumina Hiseq 2500 测序仪上机测序, 测序读长为 2×250 bp。Hiseq 文库的构建及测序在中国科学院上海植物逆境生物学研究中心基因组学平台完成。

1.5 数据处理

Hiseq 测序得到的结果采用 Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, version 1.9.0)、Mothur 等软件分析。首先对原始 FASTQ 文件进行质控、拼接, 然后将拼接后的序列进行过滤, 去除嵌合体序列。基于 97% 相似度水平, 通过聚类分析获得不同可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)。进一步抽取每个 OTU 的最优势序列作为代表性序列, 与 RDP 提供的 SILVA128 数据库进行比对并获得分类信息。采用 Mothur 软件计算多样性指数。使用 R 软件基于 Bray-Curits 距离算法进行聚类分析。采用非度量多维尺度 (Non-metric multidimensional scaling, NMDS) 分析样品间群落结构差异。采用 SPSS 20.0 对数据进行皮尔森相关性分析 (Pearson correlation) 和单因素方差分析 (One-way ANOVA), 差异显著性检验采用 Tukey 法 ($P<0.05$)。

2 结果

2.1 四种类型水稻土的理化性质及生物固氮能力

本试验中,红壤发育的水稻土 pH 最低,与其他三种类型土壤发育的水稻土相比,具有较高的有机碳、碱解氮和有效磷含量(表 1)。四种类型的水稻土经过 42 d 的田间原位 $^{15}\text{N}_2$ 培养后,计算所得其土壤生物固氮速率如图 1 所示。四种水稻土的生物固氮速率由大到小依次为:紫色土、下位砂姜土、黑土和红壤。其中,紫色土发育的水稻土生物固氮作用最为活跃,尤其在土壤表层(0~1 cm)其生物固氮速率达 $3.2\pm 0.7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,并且显著高于其他三个土壤层次检测到的生物固氮速率(图 1)。

2.2 四种类型水稻土的细菌丰度和群落多样性

针对生物固氮速率最高的表层土壤(0~1 cm),采用实时荧光定量 PCR 测定不同类型水稻土微生物 16S rRNA 基因拷贝数,结果见图 2。四种类型水稻土中的细菌丰度范围在 $1.8\times 10^7\sim 6.7\times 10^9 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土。其中,红壤发育的水稻土中细菌 16S rRNA 基因拷贝数最多,达 $(6.7\pm 1.7)\times 10^9 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土,显著高于其他三种水稻土($P<0.05$)。

Illumina 高通量测序结果显示,12 个土壤样品共获得有效序列 666 738 条,可分为 13 097 个 OTU。每个测序样品平均序列 $55\ 562\pm 9\ 298$ 条。根据样品最少序列数,将 12 个样品统一抽样至 38 715 条序列进行下游分析。操作分类单元 OTU 数目和 Chao 1 指数反映物种丰富度。由表 2 可知,下位砂姜土发育的水稻土中土壤细菌 Chao 1 指数最高,达 $7\ 095\pm 88$ 。OTU 数目与 Chao 1 指数显示相同的趋势,即下位砂姜土发育的水稻土中细菌 OTU 数目显著

高于其他三种土壤发育的水稻土($P<0.05$)。红壤和紫色土发育的水稻土中细菌 OTU 数目和 Chao 1 指数均未达显著差异。PD 指数可反映土壤细菌群落的多样性,四种水稻土中土壤细菌多样性由高到低依次为:下位砂姜土、黑土、紫色土、红壤。

2.3 四种类型水稻土的细菌群落组成

在门分类水平,四种类型水稻土的土壤微生物群落组成相似(图 3)。相对丰度 $\geq 1\%$ 的门类有 11 个,主要包含变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝藻门(Cyanobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、浮霉菌门(Planctomycetes),约占各样品序列总数的 97%。相对丰度 $< 1\%$ 的门类约有 40 个,仅占各样品序列总数的 3% 左右(图 3)。

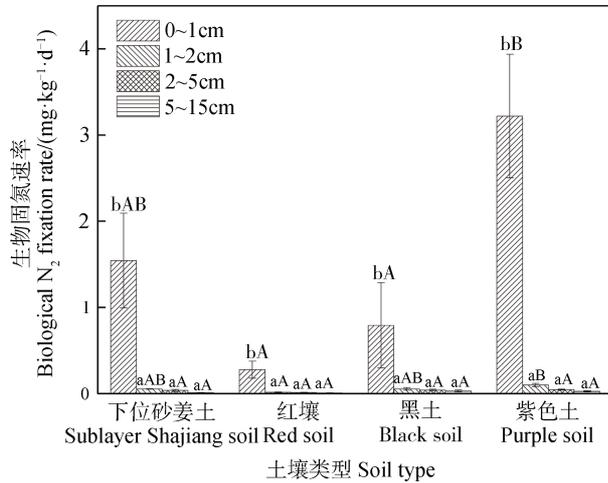
变形菌门(Proteobacteria)是土壤中最优势的菌群,相对丰度占 30% 左右。其次是酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和蓝藻门(Cyanobacteria)。这四大优势类群共占总细菌群落的 70% 以上。进一步分析土壤细菌群落在属水平的分布,结果表明相对丰度 $\geq 1\%$ 的菌属中最为优势的 6 个类群,主要是归属于变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和蓝藻门(Cyanobacteria)(图 4)。其中,厌氧黏细菌属(*Anaeromyxobacter*) 在紫色土发育的水稻土中的相对丰度显著低于其他三种水稻土($P<0.05$)。细鞘丝藻属(*Leptolyngbya*) 在紫色土发育的水稻土中相对丰度最高,约为红壤发育的水稻土的 6 倍,其相对丰度显著高于红壤发育的水稻土($P<0.05$)(图 4)。

表 1 四种类型水稻土的理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of the four types of paddy soils

处理 Treatment	pH	有机碳 Organic C ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	碱解氮 Alkaline N ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	有效磷 Available P ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	速效钾 Available K ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
下位砂姜土 ^①	6.1 \pm 0.0c	15.7 \pm 0.1a	705.9 \pm 39.8a	24.1 \pm 0.2b	53.5 \pm 0.1a
红壤 ^②	4.9 \pm 0.0a	18.3 \pm 0.0d	918.6 \pm 12.1b	41.9 \pm 0.5d	84.5 \pm 0.1c
黑土 ^③	5.4 \pm 0.0b	17.1 \pm 0.2c	697.4 \pm 12.6a	37.6 \pm 0.3c	57.5 \pm 0.1b
紫色土 ^④	7.7 \pm 0.0d	16.8 \pm 0.1b	774.8 \pm 47.6a	20.5 \pm 0.3a	112.6 \pm 0.6d

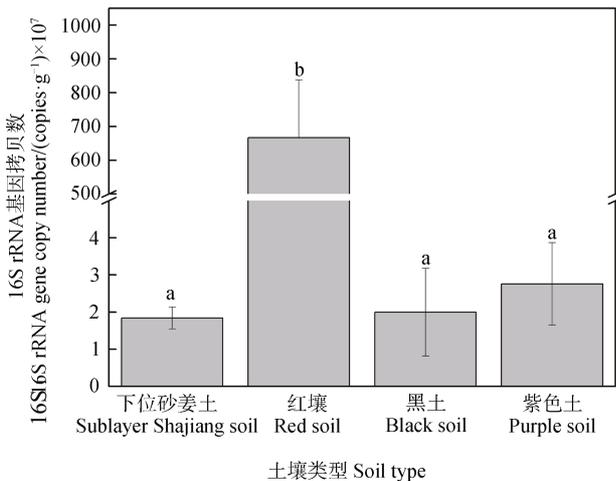
注:平均值 \pm 标准误差($n=3$);同列相同小写字母表示土壤类型间差异未达到显著水平($P>0.05$)。下同。Note: Means \pm standard deviation ($n=3$). The same lowercase letters in the same column mean non-significant difference between soil types ($P>0.05$). ①Sublayer Shajiang soil; ②Red soil; ③Black soil; ④Purple soil. The same below.



注：误差线表示标准误差 ($n=3$)。相同大写字母表示土壤类型间差异未达到显著水平 ($P>0.05$)，相同小写字母表示土壤层次间差异未达到显著水平 ($P>0.05$)。Note: Error bars represent standard deviations ($n=3$). The same uppercase letters mean non-significant difference between soil types ($P>0.05$), and the same lowercase letters mean insignificant difference between soil depths ($P>0.05$).

图 1 四种类型水稻土生物固氮速率

Fig. 1 Biological N₂ fixation rate relative to type of paddy soil



注：误差线表示标准误差 ($n=3$)。相同小写字母表示土壤类型间差异未达到显著水平 ($P>0.05$)。Note: Error bars represent standard deviation ($n=3$). The same lowercase letters mean insignificant difference between soil types ($P>0.05$).

图 2 四种类型水稻土的细菌 16S rRNA 基因的丰度

Fig. 2 Copy numbers of 16S rRNA genes in the four types of paddy soils

2.4 环境因子对水稻土的细菌丰度、群落多样性及结构的影响

通过分析四种类型土壤发育的水稻土中细菌的

丰度与土壤理化性质的关系，发现 16S rRNA 基因拷贝数与土壤有机碳、碱解氮和有效磷含量则呈极显著正相关 ($P<0.01$) (表 3)。通过分析四种类型土壤发育的水稻土中细菌群落的物种丰富度和多样性指数与土壤理化性质的关系，发现 OTU 数目、Chao 1 指数和 PD 指数均与土壤有机碳和碱解氮含量存在极显著的负相关性 ($P<0.01$) (表 3)。表明土壤有机碳和碱解氮含量显著影响水稻土中细菌丰度和群落多样性。利用非度量多维尺度分析 (Non-metric multidimensional scaling, NMDS) 对四种类型水稻土的细菌群落的相似性进行二维排序，结果表明四种类型水稻土的细菌群落结构差异显著 (Stress<0.001) (图 5)。相关性分析表明细菌群落结构分异的 NMDS1 主轴 (解释度 42%) 与土壤 pH 呈显著的正相关关系 ($P<0.01$) (表 3)，并且 NMDS1 主轴与优势类群厌氧黏细菌属 (*Anaeromyxobacter*) 和细鞘丝藻属 (*Leptolyngbya*) 显著相关 ($P<0.05$) (表 4)。表明土壤 pH 影响水稻土中优势类群的分布，是影响细菌群落结构分异的主要因子。

3 讨论

本研究采用高通量测序技术对四种不同类型土壤发育的水稻土中土壤细菌丰度和群落结构进行了分析研究。前人研究表明，土壤有机碳含量能显著影响土壤微生物的多样性和功能^[23]。土壤微生物是构成土壤肥力的重要因素。较高的微生物丰度通常意味着土壤的营养供给充足，同时也具有较高的微生物活性。在本研究中，水稻土中细菌 16S rRNA 基因拷贝数与土壤有机碳和碱解氮含量之间呈极显著正相关关系 ($r=0.76$, $P<0.01$; $r=0.74$, $P<0.01$) (表 3)。红壤发育的水稻土中的土壤细菌 16S rRNA 基因拷贝数显著高于其他三种水稻土 (图 2)。针对江西长期定位试验的红壤性水稻土的研究表明，长期施肥可增加土壤养分含量 (如有机质、全氮、有效磷和速效钾)，这在一定程度上能够给土壤微生物带来更多的碳源和营养元素^[24-25]。前人研究发现施用化肥及有机肥与化肥配施均显著提高了土壤细菌丰度^[26]。在四种水稻土中，红壤发育的水稻土的土壤有机碳、碱解氮和有效磷含量显著高于其他三种类型水稻土 (表 1)。本研究中所采集的红壤为长期水稻种植区的耕层土壤，长期耕种施肥提升了红壤

表 2 四种类型水稻土细菌丰富度指数与多样性指数

Table 2 Richness and diversity of the bacterial communities in the four types of paddy soils

土壤类型	操作分类单元数目	Chao 1 指数	PD 指数
Soil type	OTU number	Chao 1 index	Faith's index of Phylogenetic Diversity
下位砂姜土 ^①	5 011±72c	7 095±88c	151.6±2.7c
红壤 ^②	3 756±82a	5 385±65a	123.2±1.9a
黑土 ^③	4 408±58b	6 272±117b	140.2±1.0b
紫色土 ^④	4 019±186a	5 718±186a	137.0±4.2b

①Sublayer Shajiang soil; ②Red soil; ③Black soil; ④Purple soil.

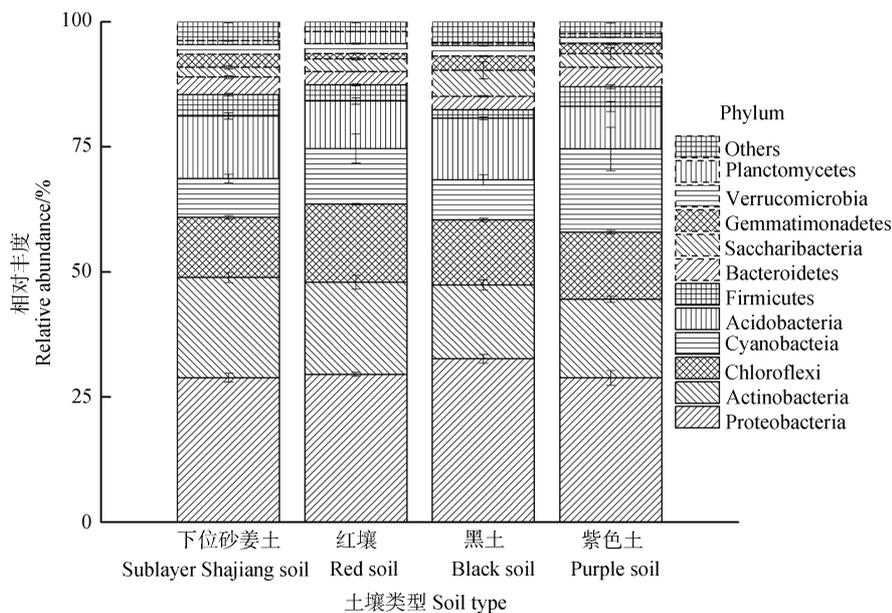


图 3 四种类型水稻土的细菌群落在门水平上的组成和相对丰度

Fig. 3 Composition and relative abundance at the phylum level of the bacterial communities in the four types of paddy soils

肥力, 为微生物创造了良好的生存环境, 进而刺激了微生物的生长和活动。因此, 推测红壤肥力较高可能是本研究中红壤发育的水稻土中细菌丰度显著高于其他三种水稻土的重要原因之一。

目前已知绝大部分的细菌均适宜在中性环境 (pH 7.0) 中生存, 仅少数细菌可以在极酸或极碱的环境下生长^[27]。前人研究发现大分子 (如 DNA, 蛋白质) 的生物过程受 pH 影响, pH 的变化会引发蛋白质发生构象的改变而导致其生理活性的下降、丧失^[28]。本研究中酸性红壤发育的水稻土中的细菌丰富度指数 (OTU 数目和 Chao 1 指数) 均显著低于下位砂姜土和黑土, 但是与中性紫色土发育的水稻土中的细菌丰富度指数无显著差异 (表 2)。目前, 微生物资源调查的研究发现土壤 pH 能够显著影响

细菌的多样性, 并发现细菌群落的分布显著受到土壤 pH 的影响^[8, 29], 土壤养分含量、温度、水分等因素也均能够影响微生物的群落组成、多样性以及分布^[3, 9-10]。pH 的改变会导致土壤营养元素 (如磷、钾) 有效性的变化^[13], 重金属离子毒性的变化等^[30], 这些均有可能对细菌群落产生显著的影响。由于底物生物可利用性的限制, 进一步可能会使得具有特定碳源偏好性的微生物类群大量增殖, 从而导致生态系统中群落多样性丢失的风险增加。在酸性土壤中, 尤其当土壤 pH<5 时, 无毒的难溶性铝硅酸盐或氧化铝极易转变为交换性铝 (主要是 Al^{3+} 、 $Al(OH)^{2+}$ 和 $Al(OH)_2^+$), 大量溶出的铝离子会抑制植物根系伸长及其吸收功能^[31]。同时有研究发现在酸性条件下, 铝离子通过与 ATP 结合导致菌株细胞

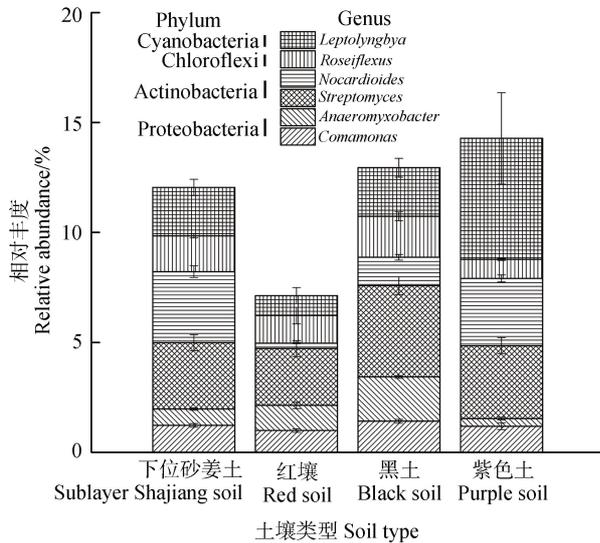


图 4 四种类型水稻土中在属水平上的优势细菌类群的相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of dominant bacterial groups at the genus level in the four types of paddy soils

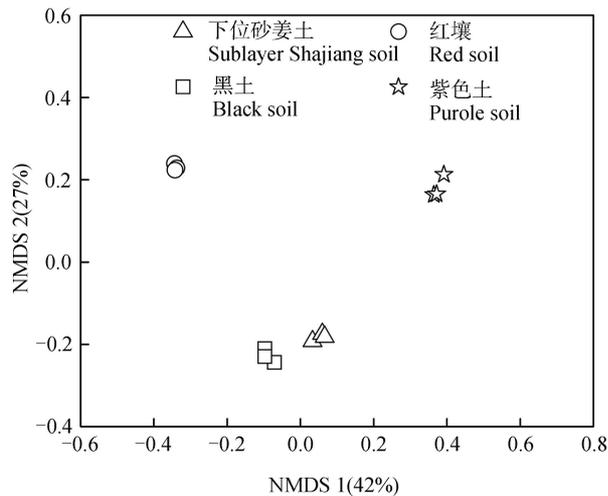


图 5 四种类型水稻土的细菌群落非度量多维尺度分析

Fig. 5 NMDS analysis of the bacterial communities in the four types of paddy soils

生理代谢失活^[32]。因此，推测 pH 降低导致土壤铝活化的毒害作用可能是本研究中酸性红壤发育的水稻土中细菌多样性降低的重要原因之一。

虽然固氮酶只有在厌氧条件下才能催化氮气还原成氨，本研究中水稻土的生物固氮速率随着土壤深度的增加而降低，表层土壤（0~1 cm）生物固氮速率显著高于其他土壤层次（1~2 cm，2~5 cm，5~15 cm）。pH 7.7 的中性紫色土和 pH 6.1 的中性下位砂姜土发育的水稻土表层土壤固氮作用较为活跃，而 pH 5.4 的酸性黑土和 pH 4.9 的酸性红壤发育的水稻土表

层土壤中的固氮作用则较为微弱。表明在一定的范围内，随着 pH 的升高，水稻土中的固氮作用也有着明显的增强（ $r=0.82$ ， $P<0.01$ ）。在进一步分析四种水稻土中的细菌优势类群的结果中发现，土壤生物固氮速率和优势类群细鞘丝藻属（*Leptolyngbya*）呈极显著的正相关关系（ $P<0.01$ ）（表 4），并且土壤 pH 与优势类群厌氧黏细菌属（*Anaeromyxobacter*）和细鞘丝藻属（*Leptolyngbya*）显著相关（ $P<0.05$ ）（表 4）。细鞘丝藻属（*Leptolyngbya*）隶属于 δ -变形菌亚纲，是一类已知具有 *nifH* 基因由固氮酶介导能将空气中的氮气还原为植物可利用氨的微生物^[33]。对于固氮菌而言，生物固氮是一个高耗能的过程，固氮基因的表达与土壤中有效氮的含量密切相关^[34-35]。当环境中有效氮富余的时候，固氮菌存在但是其固氮基因并不一定表达活性。Ma 等^[36]通过田间 $^{15}\text{N}_2$ 气体示踪法结合稳定性同位素核酸探针技术（DNA-stable isotope probing）证实稻田土壤中细鞘丝藻菌属（*Leptolyngbya*）是生物固氮最主要的贡献者之一。因此，推测酸性红壤发育的水稻土表层土壤生物固氮作用弱于紫色土的原因可能在于，首先紫色土中性偏碱的土壤 pH 环境更有利于细鞘丝藻属（*Leptolyngbya*）大量繁殖，其次红壤中较高的碱解氮含量抑制细鞘丝藻菌属（*Leptolyngbya*）的固氮活性，可能导致红壤发育的水稻土固氮速率显著低于紫色土。此外在本研究的结果中发现优势类群厌氧黏细菌属（*Anaeromyxobacter*）与土壤有效磷含量显著正相关（ $P<0.01$ ）（表 4）。已知厌氧黏细菌属（*Anaeromyxobacter*）是一类典型的呼吸型铁还原菌，具有代谢乙酸盐的特质，在厌氧条件下通过微生物异化 Fe（III）还原作用，能够有效地竞争电子供体抑制水稻土中依赖乙酸盐的产甲烷过程^[37]。因此关于厌氧黏细菌属（*Anaeromyxobacter*）的铁还原能力与土壤有效磷含量的关系值得进一步深入研究。同时，重视细鞘丝藻属（*Leptolyngbya*）在水稻土细菌群落中的优势地位，对提升水稻土的生物固氮潜力和制定稻田生物固氮调控措施具有重要参考意义。

4 结 论

本研究利用多种分子技术得出不同类型土壤发育的四种水稻土中细菌群落的数量、组成及多样性的分布规律。四种类型土壤发育的水稻土细菌群落优势类群为变形菌门（Proteobacteria）、酸杆菌门

表 3 土壤理化性质与细菌丰度、群落多样性及结构的相关性

Table 3 Relationships of soil properties with abundance, diversity and structure of the bacterial communities in the four types of paddy soils

指标 Index	pH	有机碳 Organic C	碱解氮 Alkaline N	有效磷 Available P	速效钾 Available K
16S rRNA 基因拷贝数 16S rRNA gene copy number	-0.55	0.76**	0.74**	0.66**	0.17
操作分类单元数目 OTU number	0.05	-0.84**	-0.75**	-0.4	-0.69*
Chao1 指数 Chao1 index	0.04	-0.85**	-0.75**	-0.39	-0.72**
PD 指数 Faith's index of Phylogenetic diversity	0.32	-0.90**	-0.81**	-0.59*	-0.49
NMDS1	0.98**	-0.63*	-0.43	-0.93**	0.46

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

表 4 土壤理化性质与优势细菌类群的相关性

Table 4 Relationships between the soil properties and dominant bacterial groups in the four types of paddy soils

优势类群 Abundant taxa	pH	有机碳 Organic C	碱解氮 Alkaline N	有效磷 Available P	速效钾 Available K	生物固氮速率 Biological N ₂ fixation rate	NMDS1
丛毛单胞菌属 ^①	0.10	-0.41	-0.55	-0.10	-0.34	-0.11	0.23
厌氧黏细菌属 ^②	-0.72**	0.31	-0.18	0.75**	-0.60**	-0.64**	-0.61*
链霉菌属 ^③	0.06	-0.22	-0.45	-0.02	-0.203	0.11	0.2
类诺卡氏菌属 ^④	0.79**	-0.88**	-0.61*	-0.95**	0.08	-0.62*	0.85
玫瑰弯菌属 ^⑤	-0.48	-0.17	-0.46	0.32	-0.75**	-0.3	-0.36
细鞘丝藻属 ^⑥	0.70*	-0.27	0.03	-0.61*	0.48	0.77**	0.72**

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. ①Comamonas; ②Anaeromyxobacter; ③Streptomyces; ④Nocardioideis; ⑤Roseiflexus; ⑥Leptolyngbya.

(Acidobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 和蓝藻门 (Cyanobacteria)。四种类型土壤发育的水稻土细菌群落结构差异显著。红壤发育的水稻土中细菌丰度最高, 群落多样性最低。紫色土发育的水稻土具有最高的土壤生物固氮速率, 其中优势类群细鞘丝藻属 (*Leptolyngbya*) 是潜在的生物固氮主要贡献者。土壤 pH、有机碳和碱解氮含量是显著影响四种类型土壤发育的水稻土细菌群落结构的主要因子。

参考文献 (References)

- [1] Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil[J]. *Science*, 2005, 309 (5739): 1387—1390.
- [2] Davis K E, Joseph S J, Janssen P H. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (2): 826—834.
- [3] Hartman W H, Richardson C J, Vilgalys R, et al. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105 (46): 17842—17847.
- [4] Coolon J D, Jones K L, Todd T C, et al. Long-term nitrogen amendment alters the diversity and assemblage of soil bacterial communities in tallgrass prairie[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (6): e67884.
- [5] Yuan H, Ge T, Zhou P, et al. Soil microbial biomass and bacterial and fungal community structures responses to long-term fertilization in paddy soils[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2013, 13 (5): 877—886.
- [6] Poulsen P H, Al-Soud W A, Bergmark L, et al. Effects of fertilization with urban and agricultural organic wastes in a field trial—prokaryotic diversity investigated by pyrosequencing[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 57: 784—793.
- [7] Michaela U, Jaroslav Š, Petr B. Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is

- largely determined by dominant trees[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 84: 53—64.
- [8] Lauber C L, Hamady M, Knight R, et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (15): 5111—5120.
- [9] Miller S R, Strong A L, Jones K L, et al. Bar-coded pyrosequencing reveals shared bacterial community properties along the temperature gradients of two alkaline hot springs in Yellowstone National Park[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2009, 75 (13): 4565—4572.
- [10] Angel R, Soares M I M, Ungar E D, et al. Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient[J]. *The ISME Journal*, 2010, 4 (4): 553—563.
- [11] Griffiths R I, Thomson B C, James P, et al. The bacterial biogeography of british soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13 (6): 1642—1654.
- [12] Chu H, Fierer N, Lauber C L, et al. Soil bacterial diversity in the arctic is not fundamentally different from that found in other biomes[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12 (11): 2998—3006.
- [13] Fageria N, Barbosa Filho M. Influence of pH on productivity, nutrient use efficiency by dry bean, and soil phosphorus availability in a no-tillage system[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2008, 39 (7/8): 1016—1025.
- [14] Dong W Y, Zhang X Y, Dai X Q, et al. Changes in soil microbial community composition in response to fertilization of paddy soils in subtropical China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2014, 84: 140—147.
- [15] Ahn J H, Song J, Kim B Y, et al. Characterization of the bacterial and archaeal communities in rice field soils subjected to long-term fertilization practices[J]. *Journal of Microbiology*, 2012, 50 (5): 754—765.
- [16] Ramirez K S, Lauber C L, Knight R, et al. Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems[J]. *Ecology*, 2010, 91 (12): 3463—3470.
- [17] Wu M, Qin H, Chen Z, et al. Effect of long-term fertilization on bacterial composition in rice paddy soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47 (4): 397—405.
- [18] Wakelin S A, Colloff M J, Harvey P R, et al. The effects of stubble retention and nitrogen application on soil microbial community structure and functional gene abundance under irrigated maize[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 59 (3): 661—670.
- [19] Huang C Y. *Soil science*[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000. [黄昌勇. 土壤学[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.]
- [20] Shridhar B S. Review: Nitrogen fixation microorganisms[J]. *International Journal of Microbiological Research*, 2012, 3 (1): 46—52.
- [21] Lu R K. *Analytical methods for soil and agro-chemistry*[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000. [鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.]
- [22] Bei Q, Liu G, Tang H, et al. Heterotrophic and phototrophic $^{15}\text{N}_2$ fixation and distribution of fixed ^{15}N in a flooded rice-soil system[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 59: 25—31.
- [23] Demoling F, Nilsson L O, Bååth E. Bacterial and fungal response to nitrogen fertilization in three coniferous forest soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40 (2): 370—379.
- [24] Xia X, Shi K, Huang Q R, et al. The changes of microbial community structure in red paddy soil under long-term fertilization[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52 (3): 697—705. [夏昕, 石坤, 黄欠如, 等. 长期不同施肥条件下红壤性水稻土微生物群落结构的变化[J]. 土壤学报, 2015, 52 (3): 697—705.]
- [25] Lu H F, Zheng J W, Yu X C, et al. Microbial community diversity and enzyme activity of red paddy soil under long-term combined inorganic-organic fertilization[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2015, 21 (3): 632—643. [陆海飞, 郑金伟, 余喜初, 等. 长期无机有机肥配施对红壤性水稻土微生物群落多样性及酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2015, 21 (3): 632—643.]
- [26] Yuan H Z, Qin H L, Liu S L, et al. Response of abundance and composition of the bacterial community to long-term fertilization in paddy soils [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44 (22): 4610—4617. [袁红朝, 秦红灵, 刘守龙, 等. 长期施肥对红壤性水稻土细菌群落结构和数量的影响[J]. 中国农业科学, 2011, 44 (22): 4610—4617.]
- [27] Paul D, Kumbhare S V, Mhatre S S, et al. Exploration of microbial diversity and community structure of Lonar Lake: The only hypersaline meteorite crater lake within basalt rock[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 6: 1553.
- [28] Talley K, Alexov E. On the pH-optimum of activity and stability of proteins[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2010, 78 (12): 2699—2706.
- [29] Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103 (3): 626—631.
- [30] Degryse F, Smolders E, Parker D. Partitioning of metals (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn) in soils: Concepts, methodologies, prediction and applications—A review[J]. *European Journal of Soil Science*, 2009, 60 (4): 590—612.
- [31] Ma L, Xu R K. Physico-chemical characteristics of paddy soil derived from quaternary red clay under different cultivated years[J]. *Soils*, 2010, 42 (4): 560—563. [马

- 良,徐仁扣. 不同耕种年限红壤性水稻土理化性质的变化特征[J]. 土壤, 2010, 42 (4): 560—563.]
- [32] Husaini Y, Rai L. PH dependent aluminium toxicity to nostoc linckia: Studies on phosphate uptake, alkaline and acid phosphatase activity, ATP content, photosynthesis and carbon fixation[J]. Journal of Plant Physiology, 1992, 139 (6): 703—707.
- [33] Bergman B, Gallon J R, Rai A N, et al. N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1997, 19 (3): 139—185.
- [34] Reed S C, Cleveland C C, Townsend A R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: A contemporary perspective[J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2011, 42: 489—512.
- [35] Vitousek P M, Menge D N, Reed S C, et al. Biological nitrogen fixation: Rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2013, 368 (1621): 20130119.
- [36] Ma J, Bei Q, Wang X, et al. Impacts of Mo application on biological nitrogen fixation and diazotrophic communities in a flooded rice-soil system[J]. Science of the Total Environment, 2019, 649: 686—694
- [37] Coates J D, Cole K A, Michaelidou U, et al. Biological control of hog waste odor through stimulated microbial Fe (III) reduction[J]. Applied Environmental Microbiology, 2005, 71 (8): 4728—4735.

(责任编辑: 卢 萍)