

DOI: 10.11766/trxb202302180065

丁晨晓, 刘耀威, 刘亥扬, 叶鑫喆, 陈雅雯, 叶静, 邱洪杰, 徐建明, 李勇. 干湿变化调控稻田土壤活性细菌群落与潜在功能[J]. 土壤学报, 2024, 61(5): 1421–1431.

DING Chenxiao, LIU Yaowei, LIU Haiyang, YE Xinzhe, CHEN Yawen, YE Jing, DI Hongjie, XU Jianming, LI Yong. Dry-wet Alternation Regulate Soil Active Bacterial Communities and Potential Functions in Paddy Fields[J]. Acta Pedologica Sinica, 2024, 61(5): 1421–1431.

## 干湿变化调控稻田土壤活性细菌群落与潜在功能\*

丁晨晓<sup>1</sup>, 刘耀威<sup>1</sup>, 刘亥扬<sup>2</sup>, 叶鑫喆<sup>1</sup>, 陈雅雯<sup>1</sup>, 叶静<sup>1</sup>, 邱洪杰<sup>1</sup>,  
徐建明<sup>1</sup>, 李勇<sup>1†</sup>

(1. 浙江省农业资源与环境重点实验室, 浙江大学环境与资源学院, 杭州 310058; 2. 河南农业大学环境与资源学院, 郑州 450002)

**摘要:** 大量研究发现干湿变化显著影响土壤微生物群落和温室气体排放。然而, 土壤干湿变化下活性微生物和温室气体排放的瞬时动态变化仍不清楚。因此, 本实验首先观察稻田土壤在干旱、湿润和干湿变化三种情况下细菌群落和温室气体排放的动态变化, 然后运用基于 <sup>18</sup>O 的稳定性同位素核酸探针技术 (DNA-SIP) 和高通量测序探讨干湿变化下土壤活性细菌群落的多样性、构建与潜在功能。相比于干旱和湿润处理, 干湿变化显著促进二氧化碳的排放和含有更高相对丰度的放线菌门和浮霉菌门。干湿变化下变形菌门、放线菌门和浮霉菌门的相对丰度均随着培养时间呈现显著增长。而 DNA-SIP 试验结果表明干湿变化处理活性细菌的 alpha 多样性随着培养时间显著降低, 变形菌门和放线菌门细菌是最主要的活性细菌, 其中变形菌门中黏球菌目的相对丰度随培养时间呈显著增加。活性细菌的群落构建由确定性所主导, 且随着培养进行, 确定性的主导作用进一步加强。活性细菌的功能预测进一步发现碳水化合物代谢潜能随培养时间显著降低。综上, 干湿变化处理显著改变土壤细菌群落, 并促进稻田土壤二氧化碳排放, 干湿变化处理的活性细菌由变形菌门和放线菌门细菌主导, 活性细菌的群落构建由确定性过程主导。

**关键词:** 干湿变化; 稻田土壤; 活性细菌; 多样性; 群落构建; 功能预测

中图分类号: S154.36 文献标志码: A

## Dry-wet Alternation Regulate Soil Active Bacterial Communities and Potential Functions in Paddy Fields

DING Chenxiao<sup>1</sup>, LIU Yaowei<sup>1</sup>, LIU Haiyang<sup>2</sup>, YE Xinzhe<sup>1</sup>, CHEN Yawen<sup>1</sup>, YE Jing<sup>1</sup>, DI Hongjie<sup>1</sup>, XU Jianming<sup>1</sup>, LI Yong<sup>1†</sup>

(1. College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Agricultural Resources and Environment, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. College of Environmental and Resource Sciences, Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** 【Objective】A large number of studies have found that changing from dry to wet significantly affects soil microbial

\* 国家重点研发计划项目 (2021YFD1900300) 和浙江省自然科学基金项目 (LR23D010002) 资助 Supported by National Key Research and Development Program of China (No.2021YFD1900300), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (No.LR23D010002)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: liyongcn@zju.edu.cn

作者简介: 丁晨晓 (1999—), 男, 浙江台州人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: 1160782940@qq.com

收稿日期: 2023-02-18; 收到修改稿日期: 2023-08-01; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2023-10-18

communities and greenhouse gas emissions. However, the transient dynamic of active microorganisms and greenhouse gas emissions of soils under dry to wet fluctuations are still unclear. 【Method】 In this study, the dynamic of bacterial communities and greenhouse gas emissions under dry, wet, and dry-wet changes conditions in paddy soil were investigated. The diversity, assembly, and potential functions of active bacterial communities under dry-wet change conditions were further revealed by combining  $^{18}\text{O}$ -based DNA stable isotope probing technology (DNA-SIP) and high-throughput sequencing. 【Result】 Dry-wet change treatment significantly promoted emissions of carbon dioxide and contained significantly higher relative abundances of *Actinobacteria* and *planctomycetes* compared with those in the dry and/or wet treatments. The relative abundances of *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and *planctomycetes* increased significantly along with the incubation. DNA-SIP experiment showed that the alpha diversity of active bacteria in the dry-wet change treatment decreased significantly along with the incubation. *Proteobacteria* and *Actinobacteria* dominated the active bacterial communities, and the relative abundance of *Myxococcales* in *Proteobacteria* increased significantly along with the incubation. The assembly of active bacteria was dominated by determinism, and the contribution of determinism was increased along with the incubation. Functional prediction of active bacteria further found that carbohydrate metabolic potential decreased significantly during the incubation. 【Conclusion】 In conclusion, the dry-wet change treatment significantly changed the soil bacterial community and promoted carbon dioxide emission in paddy soil. The active bacteria in the dry-wet change treatment were dominated by *Proteobacteria* and *Actinobacteria*, and their assembly was dominated by a deterministic process.

**Key words:** Dry-wet transformation; Paddy soil; Active bacteria; Diversity; Community construction Assembly process; Functional prediction

二氧化碳 ( $\text{CO}_2$ )、甲烷 ( $\text{CH}_4$ ) 和氧化亚氮 ( $\text{N}_2\text{O}$ ) 是大气中最重要温室气体, 对温室效应的产生具有极大贡献<sup>[1]</sup>。大气中大量的温室气体排放来源于土壤, 土壤微生物作为土壤生态系统的基本组成部分, 对土壤温室气体的排放有极大影响。尽管土壤生态系统中存在数以千计的微生物类群, 但大多数处于休眠状态。为了识别土壤元素循环过程真正起作用的活性微生物, 稳定性同位素核酸探针技术 (DNA-SIP) 被广泛应用<sup>[2]</sup>。相较于基于  $^{13}\text{C}$  和  $^{15}\text{N}$  的 SIP,  $^{18}\text{O}$  与  $^{16}\text{O}$  的同位素质量差更大, 使得标记和未标记组分物理分离更加容易。同时, 细胞维持和生物合成对水的普遍需求使得  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -SIP 能够识别所有生长的活性微生物<sup>[3]</sup>。更重要的是,  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  可以在不添加额外物质的情况下识别土壤中的活性微生物, 使得实验条件更接近于真实的原位环境<sup>[2]</sup>。

稻田生态系统作为地球上最大的人工湿地, 经长期淹水培育而成, 具有利用  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  标记的天然优势<sup>[2]</sup>。虽然水稻培育过程大部分处于淹水状态, 但也存在排水晒田再灌溉的干湿变化过程。研究发现干湿变化显著改变了细菌群落结构, 其中革兰氏阳性细菌呈增长趋势, 而革兰氏阴性细菌呈减少趋势<sup>[4]</sup>。干湿变化也对温室气体排放产生巨大影响, 例如干燥的稻田土壤在偶发性降水事件后产生大量的  $\text{CO}_2$ <sup>[5]</sup>。

有研究进一步发现, 干湿变化有利于反硝化过程的发生和产甲烷菌的生长, 因而排放更多的  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{CH}_4$ <sup>[6-7]</sup>。然而, 大多数研究只是关注整体微生物群落和温室气体排放的变化, 对真正起作用的活性微生物的研究较少。此外, 以往研究大多是基于长时间尺度对其进行分析, 但同时有研究显示干湿交替会对土壤温室气体排放短期内产生显著影响<sup>[5-7]</sup>。因此, 本研究在检测短时间内干湿变化下温室气体排放和整体细菌群落变化的基础上, 应用基于  $^{18}\text{O}$  的 DNA-SIP 技术, 分析活性细菌群落的变化趋势, 以期深入了解稻田土壤活性细菌群落结构、群落构建过程和潜在功能对干湿变化的响应, 为实现温室气体减排提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品概况

土壤样品采自于浙江长兴 ( $31^\circ 00'\text{N}$ ,  $119^\circ 55'\text{E}$ ) 水稻田, 属于人为水稻土。该地区属亚热带季风气候, 年均气温为  $15.6^\circ\text{C}$ , 年均降水量为  $1\,309\text{ mm}$ 。该水田的主要作物为梗稻, 为一年两熟稻田。2018年6月, 选取三个样地 ( $6\text{ m}\times 6\text{ m}$ ) 使用土钻进行五点法混合取样, 取样深度为  $0\sim 20\text{ cm}$ 。土壤样品装

入冰盒当天带回实验室, 将新鲜土样置于 4 °C 冷库保存, 取部分新鲜土样风干研磨后过 4 mm 筛, 进行土壤理化性质的测定。

在土水比为 1 : 2.5 条件下用 pH 计测量土壤 pH。土壤有机质采用重铬酸钾容量法测定。全氮和碱解氮的测定分别采用凯氏定氮法和碱解扩散法。溶解有机碳由 TOC 分析仪测定, 土壤与水的比例为 1 : 5。土壤有效磷采用碳酸氢钠进行提取, 并用钼蓝法进行测定。土壤速效钾采用乙酸铵进行提取, 用火焰光度计分析。测得土壤理化性质如下: pH 6.90±0.08, 全氮 1.01±0.05 g·kg<sup>-1</sup>, 有机质 13.5±0.1 g·kg<sup>-1</sup>, 可溶性有机碳 116±2 mg·kg<sup>-1</sup>, 碱解氮 52.4±1.5 mg·kg<sup>-1</sup>, 速效磷 9.04±0.15 mg·kg<sup>-1</sup>, 速效钾 64.0±1.0 mg·kg<sup>-1</sup>。

## 1.2 温室气体检测与 SIP 微宇宙培养实验

温室气体检测培养实验设置干旱 (D, 50%田间最大持水量), 湿润 (W, 100%田间最大持水量) 和干湿变化 (RW, 从 50%调到 100%田间最大持水量) 三个处理, D 和 W 预培养六天后, 将 6 个重复的 D 的含水量调到 100%田间最大持水量, 即 RW。将相当于 6.0 g 干土的新鲜土壤样品转移至 120 mL 血清瓶中, 调好土壤含水量后, 胶塞加铝盖封口, 25 °C 黑暗培养。其中预培养时 D 有九个重复, 正式培养时 D、W 各三个重复, RW 有六个重复。预培养结束时以及正式培养的每天对培养瓶内 CO<sub>2</sub>、CH<sub>4</sub>、N<sub>2</sub>O 浓度进行测定, 正式培养 0 d、3 d 和 7 d 进行破坏性取样, 保存在 -80 °C 冰箱中, 用以微生物分析。

SIP 微宇宙培养实验是在温室气体检测培养实验正式培养时, 对 RW 处理增加一个 H<sub>2</sub><sup>18</sup>O 的处理, <sup>18</sup>O-H<sub>2</sub>O 处理 (99 atom%, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 用以分析土壤中干湿变化下的活性细菌, <sup>16</sup>O-H<sub>2</sub>O 处理作为对照组, 其他步骤同温室气体检测培养实验。

## 1.3 DNA 提取和 SIP 分层

将正式培养 0 d、3 d 和 7 d 的土壤样品用 FastDNA Spin Kit for Soil (MP) 提取土壤基因组总 DNA。用 0.7% 的凝胶电泳检测 DNA 的完整性, NanoDrop® ND-2000 UV-Vis spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) 检测 DNA 的质量和纯度。DNA 样品 -20 °C 冰箱保存, 其中 <sup>16</sup>O3dRW、<sup>18</sup>O3dRW、<sup>16</sup>O7dRW 以及

<sup>18</sup>O7dRW 等同位素标记的 DNA 样品 (每个处理六个重复) 用以进行超高速等密度梯度离心。

超高速等密度梯度离心具体操作方法如下: 约 3 μg DNA 与 4.9 mL 氯化铯 (CsCl) 溶液混合, 调节浮力密度为 1.725 g·mL<sup>-1</sup>, 之后将混合液转移至 5.1 mL 超高速离心试管中, 调平密封后用贝克曼 Vti65.2 转子 (Beckman Coulter Inc., Palo Alto, CA, USA) 在 20 °C 条件下以 177 000 g 的速度离心 44 h。离心结束后, 收集 14 层 DNA 组分溶液并测定折光率。将分层后的 DNA 组分溶液用 PEG6000 和乙醇纯化, 溶于 30 μL TE 缓冲液中用于后续实验分析<sup>[8]</sup>。

## 1.4 16S rRNA 基因的定量 PCR 和 Miseq 测序

将 0 d、3 d 和 7 d 的总 DNA 以及上述分层纯化后的 DNA 样品进行 16S rRNA 基因的定量 PCR 分析 (LightCycler 480, Roche Applied Science), 具体引物信息为 515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA, 5'~3'), 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT, 5'~3'), 相关 PCR 条件见参考文献<sup>[9]</sup>。反应体系 20 μL, 包括 10 μL SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa, Dalian, China), 1 μL DNA 模板 (1~10 ng), 8 μL milli-Q 水, 体系中引物总浓度为 0.5 μM。通过溶解曲线, 检测荧光以确认 PCR 产物的特异性。本实验定量 PCR 扩增效率在 89%~105% 之间, R<sup>2</sup> 值在 0.990~0.999 之间。

将 0 d、3 d 和 7 d 的总 DNA 以及第 8 层的 DNA-SIP (包括轻重层) 样品进行 16S rRNA (V4) Miseq 高通量测序, 引物序列及扩增条件见文献<sup>[9]</sup>。测序得到的 fastq 文件通过 Trimmomatic 质量过滤后, 用 FLASH 进行合并, 保留长度大于 200 bp, 平均质量大于 25 的 16SrRNA 序列。对序列在 97% 相似度水平进行 OTU (可操作分类单元) 聚类, 最后根据 Silva 数据库对 OTU 进行物种注释。全部 DNA 样品抽平后共有 2 878 748 个高质量序列, 平均每个样品得到 54 316 个高质量序列。将所有 DNA 的测序数据上传至 Genome Sequence Archive (GSA) 数据库, 检索号为 CRA009634。

## 1.5 数据处理与分析

本实验中所有数据分析利用 Excel 2019, SPSS 26.0 以及 R (v3.6.3; <http://www.r-project.org>) 完成, 其中重复处理数据的标准误差由 Excel 中的 STDEV.P 函数计算得到。利用 R 语言的 vegan 包估算了 alpha 多样性指数, 并利用双因素方差分析以

及LSD事后检验计算各因素在处理间的显著性和协同效应。通过 R 包 vegan 和 ggplot2 采用主坐标分析 (PCoA) 将 beta 多样性的差异可视化, 并用 PERMANOVA 分析定量评估各因素的影响。通过 OTUs 所对应的物种注释利用 amplicon 和 reshape2 计算总数前 8 物种门的相对丰度。

为了量化干湿变化条件下活性细菌群落构建与非活性细菌群落构建的差异, 应用归一化随机率 (NST) 来评估细菌群落组装的潜在机制。NST 是一个用于评估群落构建过程中生态随机性的指标, 以 50% 为边界, 大于 50% 以随机性为主导, 而小于 50% 则以确定性为主导。本实验中 NST 指数基于 cao、mGower 距离矩阵计算, 并进而对数据进行双因素方差分析和 LSD 检验, 判断微生物活性和培养天数在重湿润细菌群落构建中的影响。

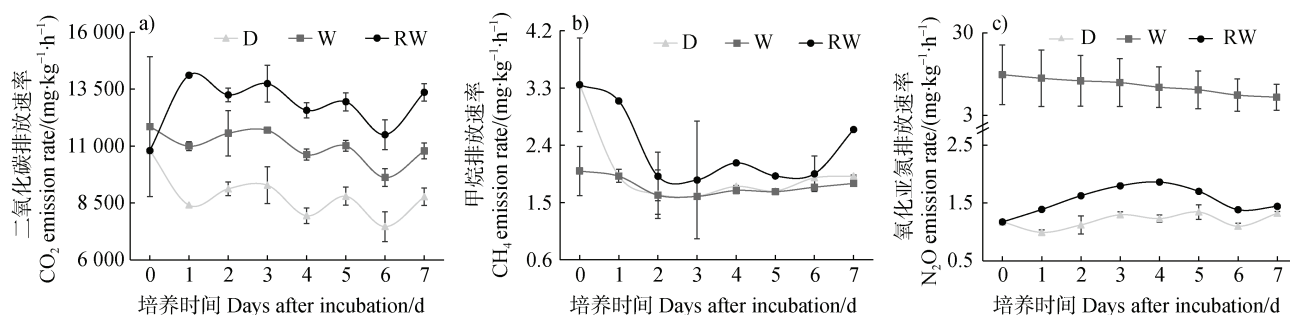
为了进一步比较干湿变化条件下活性细菌群落与非活性细菌群落以及不同培养天数条件下的潜在功能差异, 通过 Tax4fun 预测了细菌群落的潜在功

能。通过 16S rRNA 测序数据与 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 功能数据库的比对, 显著识别细菌二级代谢通路。在计算各预测功能的相对丰度后, 将不同处理间功能进行显著性差异分析 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果

### 2.1 不同水分条件下稻田土壤的温室气体排放

温室气体微宇宙培养实验发现不同含水率显著影响稻田土壤的温室气体排放速率 ( $P < 0.05$ )。经过 7 天的微宇宙培养, 湿润处理较干旱处理  $\text{CO}_2$  ( $11020.55 \pm 321.00$  较  $8824.23 \pm 247.97 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $P < 0.001$ ) 与  $\text{N}_2\text{O}$  ( $12.70 \pm 7.17$  较  $1.20 \pm 0.04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $P = 0.014$ ) 排放显著增加 (图 1)。相较于干旱和湿润处理, 干湿变化下显著促进了  $\text{CO}_2$  ( $12786.22 \pm 470.93$  较  $11020.55 \pm 321.00$ ,  $8824.23 \pm 247.97 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $P < 0.001$ ) 的排放, 并且  $\text{CH}_4$  ( $2.36 \pm 0.20$  较  $1.97 \pm 0.03$ ,  $1.75 \pm 0.03 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) 的排放也略有增加 (图 1)。



注: D 代表含水量为 50% 田间最大持水量的土壤处理, W 代表含水量为 100% 田间最大持水量的土壤处理, RW 代表含水量从 50% 田间最大持水量调至 100% 田间最大持水量的土壤处理。误差棒由 STDEV.P 函数计算得到。Note: D represents the treatment with 50% field maximum water capacity, W represents the treatment with 100% field maximum water capacity, and RW represents the treatment with 50% field maximum water capacity to 100% field maximum water capacity. The error bar is calculated by the STDEV.P function.

图 1 二氧化碳排放速率 (a)、甲烷排放速率 (b) 和氧化亚氮排放速率 (c) 随培养时间的变化

Fig. 1 Carbon dioxide emission rate (a), methane emission rate (b), and nitrous oxide emission rate (c) were analyzed

### 2.2 稻田土壤总细菌群落的多样性与组成

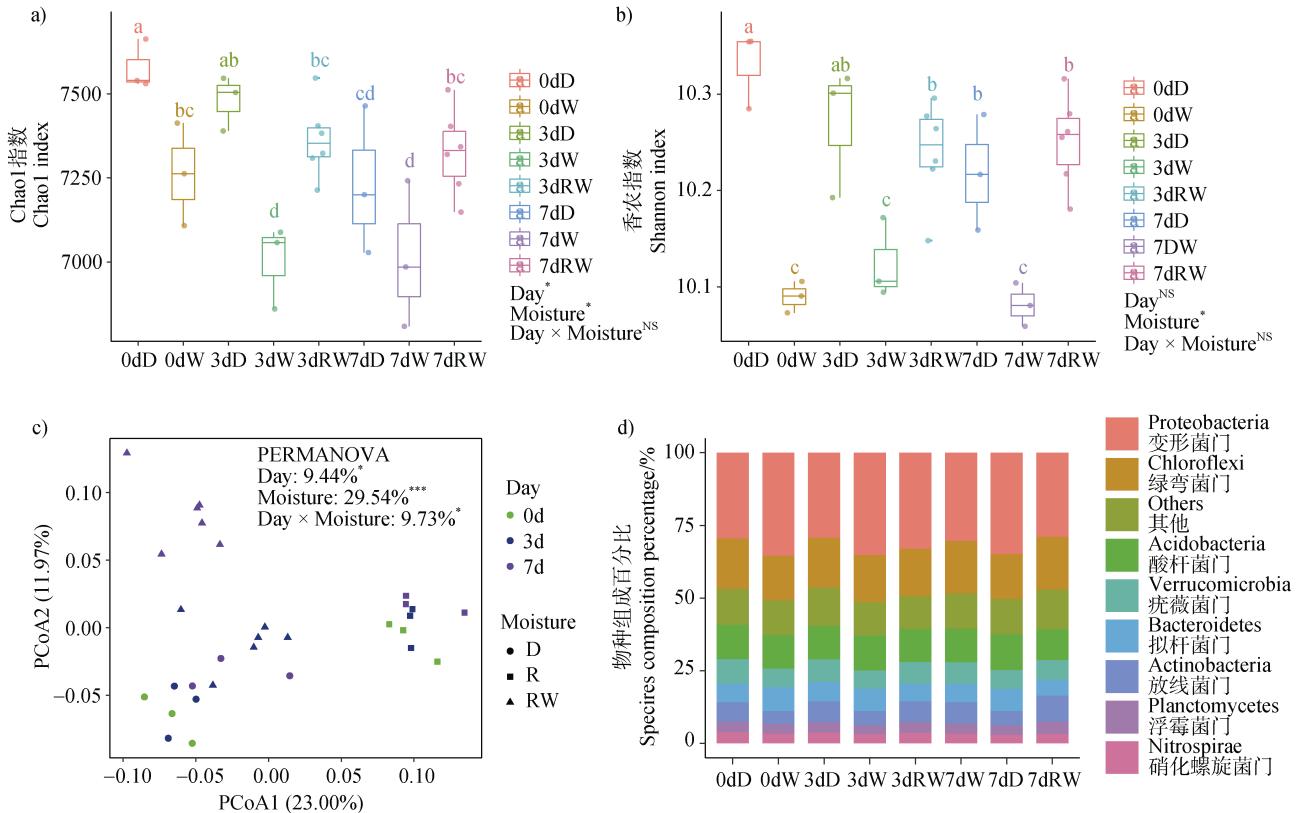
微宇宙培养实验中, 稻田土壤总细菌群落的 alpha、beta 多样性以及群落组成如图 2 所示。就 alpha 多样性而言, 土壤含水率 ( $P < 0.001$ ) 显著影响细菌的 Chao1 指数和 Shannon 指数, 干旱和干湿变化处理下的 Shannon 指数显著高于湿润处理, 细菌 Chao1 指数随培养时间 ( $P = 0.005$ ) 显著降低 (图 2a, 图 2b)。就 beta 多样性而言, 土壤含水率、培养天数

以及他们的协同效应均显著影响土壤细菌的 beta 多样性, 其中土壤含水率的影响最大, 解释了 29.54% 的细菌群落变化 (图 2c)。

变形菌门 (Proteobacteria) 是稻田土壤总细菌群落中相对丰度最高的门, 干旱、湿润、干湿变化下土壤变形菌门占总细菌相对丰度分别为  $29.75\% \pm 2.22\%$ 、 $35.27\% \pm 1.27\%$ 、 $31.08\% \pm 2.82\%$ 。绿弯菌门 (Chloroflexi,  $16.83\% \pm 1.75\%$ ) 和酸杆菌门

(Acidobacteria,  $1.40\% \pm 0.71\%$ ) 分别为总细菌群落中相对丰度第二和第三高的门。干湿变化下放线菌门 (Actinobacteria,  $7.98\% \pm 1.06\%$ ) 和浮霉菌门 (Planctomycetes,  $3.97\% \pm 0.50\%$ ) 的相对丰度显著高于干旱下放线菌门 ( $7.06\% \pm 0.52\%$ ,  $P=0.013$ ) 和浮霉菌门 ( $3.54\% \pm 0.29\%$ ,  $P=0.019$ ) 以及湿润下放线菌门 ( $4.75\% \pm 0.32\%$ ,  $P<0.001$ )、浮霉菌门 ( $3.24\% \pm$

$0.23\%$ ,  $P<0.001$ ) 的相对丰度。变形菌门的相对丰度在 0~3d 的短期干湿变化内实现显著增长 ( $29.50\% \pm 2.62\%$  至  $33.11\% \pm 1.72\%$ ,  $P=0.047$ )。干湿变化处理下放线菌门 ( $7.06\% \pm 0.44\%$  至  $8.91\% \pm 0.66\%$ ,  $P<0.001$ ) 和浮霉菌门 ( $3.67\% \pm 0.49\%$  至  $4.28\% \pm 0.81\%$ ,  $P=0.038$ ) 的相对丰度随培养时间均显著增长。



注：不同字母表示总细菌群落 alpha 多样性 (a-b) 在各处理间的显著性差异 ( $P<0.05$ )。其中，\*\*\*代表  $P<0.001$ ，\*\*代表  $P<0.01$ ，\*代表  $P<0.05$ ，NS 代表  $P>0.05$ 。下同。Significant differences in alpha diversity (a-b) of total bacterial community among treatments ( $P<0.05$ ) are indicated by letters. Respectively, \*\*\* represents  $P<0.001$ , \*\* represents  $P<0.01$ , \* represents  $P<0.05$ , and NS represents  $P>0.05$ . The same as below.

图 2 总细菌群落 alpha 多样性 (a-b) 和总细菌群落 beta 多样性 (c)，总细菌群落物种组成 (d) 分析

Fig. 2 Alpha diversity (a-b), Beta diversity (c), and species composition (d) of total bacterial communities were analyzed

### 2.3 DNA-SIP 技术鉴定活性细菌

SIP 微宇宙培养实验中, DNA-SIP 离心后每个样品分为 14 层, 浮力密度在  $1.626 \sim 1.791 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  之间。将分层后的细菌 DNA 进行 16S rRNA 基因的定量 PCR 分析得到基因拷贝数, 将每层的基因拷贝数与各层中最大的基因拷贝数作比, 得到各层次的浮力密度梯度的分布图 (图 3)。根据 16S rRNA 基因相对丰度的分布状况, 选择了  $^{16}\text{O}$  和  $^{18}\text{O}$

标记的重湿润样品的重层 DNA (8 层) 进行高通量测序, 对干湿变化下的土壤活性细菌进行进一步分析。

### 2.4 干湿变化下稻田土壤活性细菌群落的多样性与组成

干湿变化下活性细菌群落的 alpha、beta 多样性以及群落组成如图 4 所示。就 alpha 多样性而言, Shannon 指数 ( $P=0.038$ ) 在活性细菌和非活性细菌

之间存在显著差异,且活性细菌的 Shannon 指数低于非活性细菌。培养天数( $P<0.001$ )显著影响 Chao1 指数,活性细菌 Chao1 指数随着培养时间呈现降低

的趋势(图 4a,图 4b)。就 beta 多样性而言,细菌群落在重湿润状态下的培养天数、活性均存在显著差异(图 4c)。

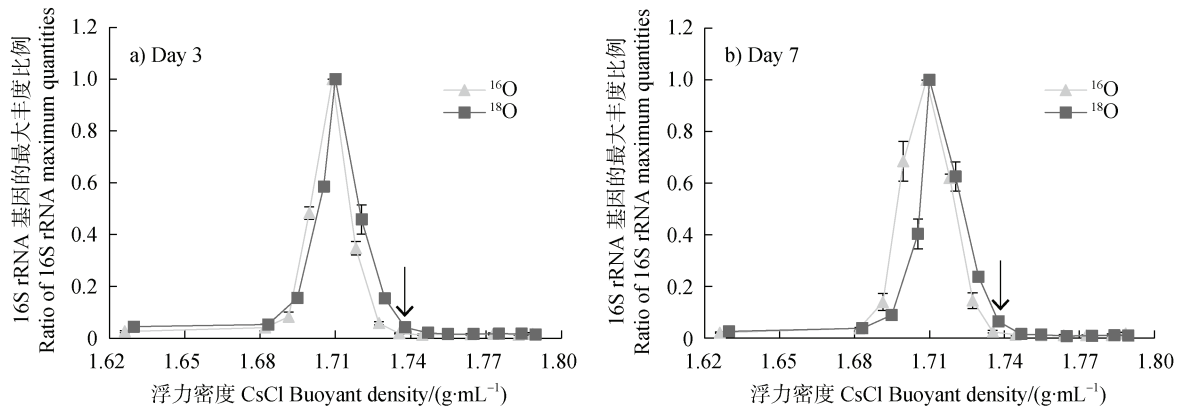


图 3 16S rRNA 基因相对丰度在不同浮力密度上的分布

Fig. 3 Distribution of relative abundance of 16S rRNA genes at different buoyancy densities

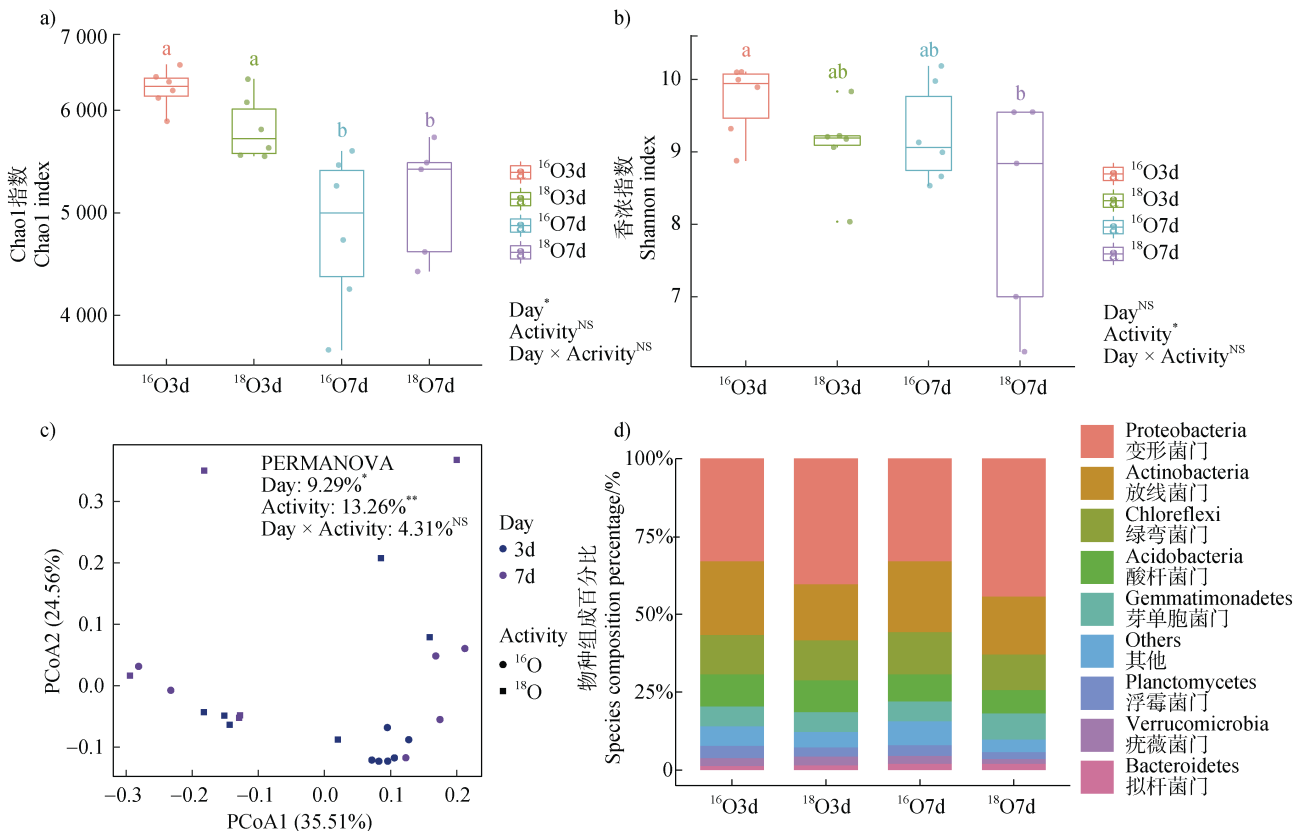


图 4 干湿变化下活性细菌群落 alpha 多样性 (a-b) 和活性细菌群落 beta 多样性 (c), 活性细菌群落物种组成 (d)

Fig. 4 Alpha diversity (a-b), Beta diversity (c), and species composition (d) of active bacterial communities under rewetting were analyzed

就群落组成来看,活性细菌群落中以变形菌门 (Proteobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria) 为主,各占活性细菌群落的 42.02%±4.73% 和 18.34%±

0.21%。占变形菌门中相对丰度前三的三个目分别为 Betaproteobacteriales (26.33%±3.25%), Spingomonadales (20.52%±4.92%) 和 Myxococcales (16.60%±4.74%)。



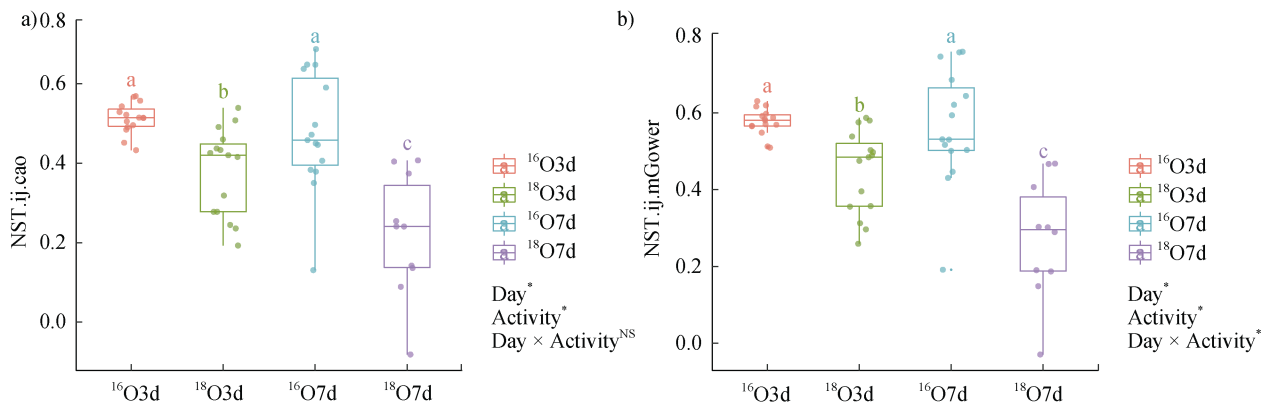
第 7 天的变形菌门相对丰度 ( $44.38\% \pm 4.79\%$ ) 为第 3 天变形菌门 ( $40.36\% \pm 2.24\%$ ) 相对丰度的 1.1 倍, 且变形菌门中的 Myxococcales 目的相对丰度也随着培养时间呈显著增加 ( $13.04\% \pm 0.54\%$  到  $21.94\% \pm 2.89\%$ ,  $P < 0.001$ )。Gaiellales、Micrococcales 和 Micromonosporales 为活性细菌放线菌门中相对丰度前三的三个目, 各占放线菌门的  $21.78\% \pm 3.44\%$ 、 $14.19\% \pm 2.12\%$  和  $10.69\% \pm 1.84\%$ 。此外, 芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 的相对丰度随着培养时间呈显著上升 ( $6.37\% \pm 1.15\%$  至  $8.10\% \pm 0.37\%$ ,  $P = 0.021$ )。

## 2.5 活性细菌群落的构建与潜在功能

为明确干湿变化下水稻土活性细菌群落的构建

情况, 通过 NST 分析进行评估。无论在 NST.cao 和 NST.mGower 中培养天数和细菌活性均对群落构建过程产生显著的影响, 其中活性细菌群落构建则以确定性为主 (NST.ij.mGower  $< 50\%$ ), 而非活性细菌群落构建以随机性为主 (NST.ij.mGower  $> 50\%$ )。活性细菌群落构建的确定性主导过程随着培养时间进一步加强 (图 5)。

对活性细菌进行 Tax4fun 功能预测, 并利用 KEGG 数据库进行功能比对得到以下结果。预测得到的潜在功能主要包括代谢、有机系统、人类疾病、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程等六种一级功能, 而在活性细菌中又以代谢功能基因占据绝对优势 (相对丰度  $> 75\%$ ) (表 1)。



注: \*代表  $P < 0.05$ , NS 代表  $P > 0.05$ 。Note: \* represents  $P < 0.05$ , NS represents  $P > 0.05$ .

图 5 干湿变化下活性细菌的群落构建情况

Fig. 5 Assembly processes of the active bacterial community under rewetting

表 1 各处理中的 Tax4fun 预测功能相对丰度占比

Table 1 Relative abundances of Tax4fun predicted functions in each treatment

	<sup>16</sup> O3dRW	<sup>18</sup> O3dRW	<sup>16</sup> O7dRW	<sup>18</sup> O7dRW
有机系统 Organismal systems	0.015	0.014	0.015	0.015
代谢 Metabolism	0.758	0.764	0.755	0.758
人类疾病 Human diseases	0.032	0.032	0.030	0.031
遗传信息处理 Genetic Information processing	0.036	0.043	0.031	0.036
环境信息处理 Environmental information processing	0.095	0.087	0.102	0.096
细胞过程 Cellular processes	0.064	0.060	0.067	0.064

对预测功能中的二级功能进一步进行差异性比较, 发现活性和非活性细菌群落的潜在功能存在一定差异 (图 6c、图 6d)。干湿变化下活性细菌的碳水化合物代谢潜在功能的相对丰度随着培养时间的延长显著降低 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 干湿变化对土壤温室气体排放和总细菌群落的影响

相较于干旱处理, 湿润处理显著增加  $\text{CO}_2$  排放

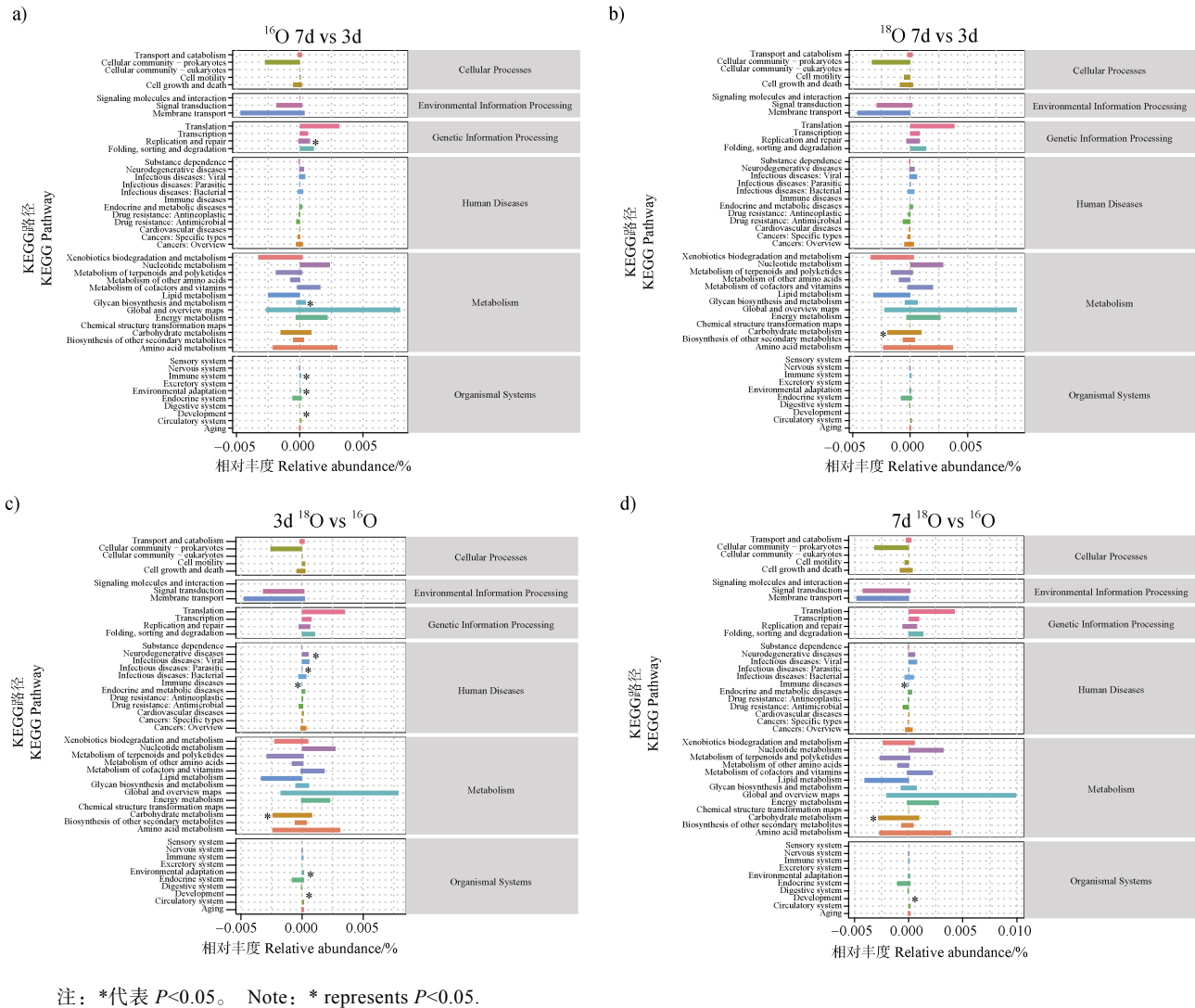


图 6 干湿变化下活性和非活性细菌在不同培养时间下的 Tax4fun 功能预测差异比较

Fig. 6 Comparison of Tax4Fun functional prediction differences between active and inactive bacteria under rewetting at different incubation times

(图 1a), 这可能与低含水量 (50%田间最大持水量) 会降低土壤微生物和酶活性, 不利于呼吸有关<sup>[10]</sup>。湿润水稻土中  $N_2O$  的排放显著高于干旱水稻土 (图 1c), 这可能与 100%田间最大持水量条件是适宜硝化和反硝化同时产生  $N_2O$  的最佳含水量有关<sup>[11]</sup>。同时, 干湿变化显著促进  $CO_2$  排放 (图 1a)。干湿变化下  $CO_2$  的大量排放可能由以下两种机制导致: 从生理上讲干湿变化条件下微生物细胞为维持渗透压平衡而快速消耗原先集中在微生物细胞中的胞内溶质有关; 物理上指的是在土壤聚集体被润湿破坏后, 受物理保护的有机碳暴露于微生物, 从而迅速消耗掉有机碳并产生  $CO_2$ <sup>[12]</sup>。并且干湿变化会打破原先的

干燥条件, 从而导致土壤理化性质和微生物可能会出现短期响应进而导致更多的温室气体排放<sup>[4]</sup>, 例如  $CH_4$  排放的增加可能是在干湿变化下产甲烷菌的更多繁殖导致的<sup>[7]</sup> (图 1b)。

干湿变化下和干旱处理下细菌的 Shannon 多样性显著高于湿润处理下细菌的 Shannon 多样性 (图 2a, 图 2b), 这可能是因为长期湿润对土壤细菌多样性有负面影响<sup>[13]</sup>。同时 beta 多样性相关分析进一步揭示了培养时间和含水率对细菌群落结构产生显著影响 (图 2c)。群落组成分析表明, 变形菌门是稻田土壤细菌群落中占比最多的门, 在湿润处理下占比最多, 且在干湿变化的 0 到 3d 时间内显著增



加(图 2d)。这与变形菌门更适应湿润条件,在这种情况下更有竞争力的繁殖策略有关,且变形菌是土壤生态系统重要代谢活动的关键驱动因素,可能对 CO<sub>2</sub> 的产生起到重要的推进作用<sup>[14-15]</sup>。研究进一步发现,干湿变化下放线菌门和浮霉菌门的相对丰度,显著高于干旱和湿润下放线菌门和浮霉菌门的相对丰度,且随着培养时间呈现显著增加(图 2d)。放线菌门相对丰度的上升可能是因为革兰氏阳性菌较起革兰氏阴性菌更能抵抗干湿变化的胁迫,放线菌门作为革兰氏阳性菌更能抵抗干湿变化下胁迫的干扰<sup>[4]</sup>。浮霉菌门细菌主要为自养细菌,对养分需求较低,能够及时适应干湿变化下的缺氧环境,因此在干湿交替条件下相对丰度显著增加<sup>[16-17]</sup>。并且放线菌和浮霉菌分别具有产生次生代谢产物和同化胞外多糖的作用,可能对干湿变化下 CO<sub>2</sub> 排放的增加产生重要影响<sup>[18-19]</sup>。

### 3.2 干湿变化下活性细菌群落的多样性与组成

本研究通过 <sup>18</sup>O 标记的水对干湿变化下水稻土壤中的活性细菌进行探究,并在 3 天和 7 天成功对 <sup>18</sup>O 标记的活性细菌进行了分离和测定(图 3)。干湿变化下变形菌门、放线菌门主导了活性细菌群落,这可能与变形菌门和放线菌门细菌具有广泛的生态位有关<sup>[20]</sup>。且第 3 天变形菌门相对丰度随着培养至第 7 天增加了 12.8%,这主要是由 Myxococcales 在变形菌门的相对丰度随着培养显著增加导致的,因为相较于其他变形菌门中目水平上的细菌,Myxococcales 具有较高的环境适应潜力和更广泛的捕食范围<sup>[21]</sup>。同时,芽单胞菌门也随着培养呈显著增加,这也可以归因于它们具备干湿变化下导致的低氧条件下的存活能力<sup>[22]</sup>。以上结果说明总体群落变化能一定程度反映活性微生物的生长趋势,但如果要深入探究活性微生物仍需通过 SIP 标记分离。

结果表明,干湿变化进一步导致了活性细菌与非活性细菌群落 alpha、beta 多样性的显著差异,这可能是干湿变化下快速增长的活性共养细菌的生长,进而竞争排斥其他细菌导致活性细菌群落变化的结果<sup>[23]</sup>。活性细菌 alpha 多样性(Chao1 和 Shannon 指数)与培养时间呈负相关关系(图 4a、图 4b)。这是因为土壤活性细菌的生存偏好与其呼吸特性紧密相关,而大部分细菌为需氧菌,无法持续适应干湿变化所导致的淹水环境的厌氧条件的影响,且分

离和孤立的微观世界也可能影响细菌的 alpha 多样性<sup>[24-25]</sup>。培养时间也对活性和非活性细菌的 beta 多样性产生显著影响(图 4c),这表明随着时间的推移,干湿变化下的土壤可以通过环境对不同类群的过滤对微生物群落产生实质性的影响。

### 3.3 干湿变化下活性和非活性细菌群落的构建与功能预测

根据群落构建的结果来看,非活性细菌群落以随机性为主导(NST.ij.mGower>50%),而活性细菌群落则以确定性为主导(NST.ij.mGower<50%)(图 5)。这可能是由于相较于非活性细菌,活性细菌更容易受干湿变化和环境因子等确定性因素的限制,且物种分选强度可能随着细菌的代谢活性水平而增强,活性细菌相较于非活性细菌有着更强的代谢活性<sup>[20]</sup>,因此活性细菌群落构建由确定性过程所主导。第 7 天活性细菌群落构建的确定性过程较第 3 天更强,这可能是因为随着培养的进行,活性细菌多样性减少,而在低多样性群落中,确定性组装过程占主导地位<sup>[26]</sup>。此外,活性细菌的生长繁殖消耗了土壤养分,在限制性营养环境中群落构建以确定性为主<sup>[27]</sup>。

功能预测分析表明,活性细菌与非活性细菌的潜在功能存在显著差异,而活性细菌较非活性细菌与功能联系更加紧密<sup>[28]</sup>。根据干湿变化下的活性细菌功能预测情况,干湿变化下代谢是活性细菌最重要的潜在功能,这与活性细菌中占主导地位的变形菌门和放线菌门对代谢相关功能有着重要的促进作用的结果一致<sup>[15-18]</sup>。活性细菌中碳水化合物代谢潜在功能的相对丰度随着培养显著降低(图 6b),这可以归因于干湿变化导致的 100% 田间最大持水量的淹水条件,降低了土壤中活性细菌的碳水化合物代谢<sup>[29-30]</sup>。

## 4 结 论

干湿变化下,土壤显著排放更多二氧化碳,并对细菌群落的多样性和组成产生显著影响。干湿变化下变形菌门、放线菌门、浮霉菌门随培养时间显著增加,而活性细菌群落中变形菌门和放线菌门细菌占据主导地位,这与干湿变化下总细菌群落的变化趋势较为一致。活性细菌群落构建以确定性为主导,且群落确定性主导过程随培养时间进一步加强。

代谢功能是活性细菌群落最重要的预测功能, 并且碳水化合物代谢预测功能的相对丰度随培养时间在活性微生物群落中呈显著下降。综上所述, 干湿变化下水稻土排放更多以二氧化碳为主, 变形菌门和放线菌门主导的活性细菌群落构建以确定性为主导, 且表达以代谢功能为主导的潜在功能。

### 参考文献 (References)

- [ 1 ] Zhang Y M, Hu C S, Zhang J B, et al. Research advances on source/sink intensities and greenhouse effects of CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O in agricultural soils[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2011, 19 ( 4 ): 966—975. [张玉铭, 胡春胜, 张佳宝, 等. 农田土壤主要温室气体 (CO<sub>2</sub>、CH<sub>4</sub>、N<sub>2</sub>O) 的源/汇强度及其温室效应研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2011, 19 ( 4 ): 966—975.]
- [ 2 ] Ding C X, Xu X J, Liu Y W, et al. Diversity and assembly of active bacteria and their potential function along soil aggregates in a paddy field[J]. Science of the Total Environment, 2023, 866: 161360.
- [ 3 ] Schwartz E. Characterization of growing microorganisms in soil by stable isotope probing with H<sub>2</sub><sup>18</sup>O[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73 ( 8 ): 2541—2546.
- [ 4 ] Chodak M, Gołębiewski M, Morawska-Płoskonka J, et al. Soil chemical properties affect the reaction of forest soil bacteria to drought and rewetting stress[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65 ( 3 ): 1627—1637.
- [ 5 ] Aanderud Z T, Lennon J T. Validation of heavy-water stable isotope probing for the characterization of rapidly responding soil bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77 ( 13 ): 4589—4596.
- [ 6 ] Liu Y, Cong R H, Liao S P, et al. Rapid soil rewetting promotes limited N<sub>2</sub>O emissions and suppresses NH<sub>3</sub> volatilization under urea addition[J]. Environmental Research, 2022, 212: 113402.
- [ 7 ] Weil M, Wang H T, Bengtsson M, et al. Long-term rewetting of three formerly drained peatlands drives congruent compositional changes in pro- and eukaryotic soil microbiomes through environmental filtering[J]. Microorganisms, 2020, 8 ( 4 ): 550.
- [ 8 ] Pan H, Li Y, Meng C M, et al. Effect of nitrogen level on the interaction between soil methane oxidation and nitrifying microorganisms[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59 ( 2 ): 557—567. [潘红, 李勇, 孟春梅, 等. 氮素水平对土壤甲烷氧化和硝化微生物相互作用的影响[J]. 土壤学报, 2022, 59 ( 2 ): 557—567.]
- [ 9 ] Walters W, Hyde E R, Berg-Lyons D, et al. Improved bacterial 16s rRNA gene (v4 and v4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys[J]. mSystems, 2015, 1( 1 ): e00009-e00015.
- [ 10 ] Lu B Q, Song L Q, Zang S Y, et al. Warming promotes soil CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> emissions but decreasing moisture inhibits CH<sub>4</sub> emissions in the permafrost peatland of the Great Xing'an Mountains[J]. Science of the Total Environment, 2022, 829: 154725.
- [ 11 ] Liu X J, Mosier A R, Halvorson A D, et al. Dinitrogen and N<sub>2</sub>O emissions in arable soils: Effect of tillage, N source and soil moisture[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39 ( 9 ): 2362—2370.
- [ 12 ] Schimel J P. Life in dry soils: Effects of drought on soil microbial communities and processes[J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2018, 49: 409—432.
- [ 13 ] Li G C, Niu W Q, Sun J, et al. Soil moisture and nitrogen content influence wheat yield through their effects on the root system and soil bacterial diversity under drip irrigation[J]. Land Degradation & Development, 2021, 32 ( 10 ): 3062—3076.
- [ 14 ] Na X F, Yu H L, Wang P, et al. Vegetation biomass and soil moisture coregulate bacterial community succession under altered precipitation regimes in a desert steppe in northwestern China[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 136: 107520.
- [ 15 ] Salam L B, Obayori O S. Structural and functional metagenomic analyses of a tropical agricultural soil[J]. Spanish Journal of Soil Science, 2019, 9 ( 1 ): 1—23.
- [ 16 ] Kalam S, Basu A, Podile A R. Difficult-to-culture bacteria in the rhizosphere: The underexplored signature microbial groups[J]. Pedosphere, 2022, 32 ( 1 ): 75—89.
- [ 17 ] Liu K, Ge Z, Xu Y D, et al. Responses of soil microbial community to drying-wetting alternation relative to tillage mode[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57 ( 1 ): 206—216. [刘奎, 葛壮, 徐英德, 等. 不同耕作方式下黑土微生物群落对干湿交替的响应[J]. 土壤学报, 2020, 57 ( 1 ): 206—216.]
- [ 18 ] Yan B F, Liu N, Liu M H, et al. Soil actinobacteria tend to have neutral interactions with other co-occurring microorganisms, especially under oligotrophic conditions[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23( 8 ): 4126—4140.
- [ 19 ] Wang X Q, Sharp C E, Jones G M, et al. Stable-isotope probing identifies uncultured planctomycetes as primary degraders of a complex heteropolysaccharide in soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81 ( 14 ): 4607—4615.
- [ 20 ] Wisnoski N I, Muscarella M E, Larsen M L, et al. Metabolic insight into bacterial community assembly across ecosystem boundaries[J]. Ecology, 2020, 101( 4 ): e02968.
- [ 21 ] Wang W H, Luo X, Ye X F, et al. Predatory Myxococcales are widely distributed in and closely correlated with the bacterial community structure of

- agricultural land[J]. *Applied Soil Ecology*, 2020, 146: 103365.
- [ 22 ] DeBruyn J M, Nixon L T, Fawaz M N, et al. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 ( 17 ): 6295—6300.
- [ 23 ] Adamczyk M, Perez-Mon C, Gunz S, et al. Strong shifts in microbial community structure are associated with increased litter input rather than temperature in high Arctic soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 151: 108054.
- [ 24 ] Shen R C, Lan Z C, Rinklebe J, et al. Flooding variations affect soil bacterial communities at the spatial and inter-annual scales[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 759: 143471.
- [ 25 ] Lindström E S, Langenheder S. Local and regional factors influencing bacterial community assembly[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2012, 4( 1 ): 1—9.
- [ 26 ] Xun W B, Li W, Xiong W, et al. Diversity-triggered deterministic bacterial assembly constrains community functions[J]. *Nature Communications*, 2019, 10 ( 1 ): 1—10.
- [ 27 ] Chase J M. Stochastic community assembly causes higher biodiversity in more productive environments[J]. *Science*, 2010, 328 ( 5984 ): 1388—1391.
- [ 28 ] Bastida F, Torres I F, Moreno J L, et al. The active microbial diversity drives ecosystem multifunctionality and is physiologically related to carbon availability in Mediterranean semi-arid soils[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25 ( 18 ): 4660—4673.
- [ 29 ] Moreno-Espindola I P, Ferrara-Guerrero M J, Luna-Guido M L, et al. The bacterial community structure and microbial activity in a traditional organic milpa farming system under different soil moisture conditions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2737.
- [ 30 ] Ding X H, Luo J, Li Y Z, et al. Survival of completely submerged *Salix triandroides* cuttings is associated with non-structural carbohydrate metabolism[J]. *Journal of Freshwater Ecology*, 2019, 34 ( 1 ): 395—404.

( 责任编辑: 檀满枝 )