

不同施肥处理对植烟土壤细菌群落的影响^①

王珏^{1,2}, 杜琴¹, 彭双^{1,3}, 林先贵¹, 王一明^{1,2*}, 李军营⁴, 戴勋⁵, 谢新乔⁵

(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; 3 江苏开放大学, 南京 210036; 4 云南省烟草农业科学研究院, 昆明 650021; 5 红塔烟草(集团)有限责任公司, 云南玉溪 653100)

摘要: 应用定量 PCR 技术和高通量测序技术研究施用有机肥(YJ)、有机无机肥(YW)和无机肥(WJ)3 a 后土壤理化性质和细菌群落结构、数量和功能的变化。结果显示不同施肥处理下, 土壤理化性质发生改变, 其中 WJ 和 YJ 处理降低了土壤 pH, 但 YJ 处理能显著提升土壤有机质含量, 而 YW 处理在维持土壤 pH 的同时提高土壤速效养分和有机质含量。土壤细菌数量、群落结构和功能也相应地发生变化, YJ 和 YW 处理土壤中的细菌 16S rRNA 基因拷贝数显著高于 WJ, YW 处理的土壤细菌群落 alpha 多样性最高。主坐标分析和 ANOSIM 检验进一步表明, 影响土壤细菌群落结构的最主要因素是土壤 pH。此外, 施肥 3 a 后土壤中部分益生菌相对丰度也发生明显的变化, YW 处理土壤中 Gemmatimonadaceae、Micrococcaceae 和 Haliangiaceae 等植物促生菌的丰度显著较高, YJ 处理土壤中 Intrasporangiaceae、Xanthomonadaceae、Chitinophagaceae、Burkholderiaceae 等具有固氮或生防功能的细菌丰度较高, YW 和 YJ 处理均增加了固氮菌 Rhizobiaceae 的丰度。细菌群落结构的改变进一步影响了细菌群落的功能, YW 处理显著增加了土壤细菌群落的硝化功能。本研究结果可为烟叶生产中合理施肥提供科学依据。

关键词: 施肥; 植烟土壤; 高通量测序; 细菌群落

中图分类号: S154.3 **文献标志码:** A

Effects of Different Fertilization Treatments on Bacterial Community in Tobacco-planting Soil

WANG Jue^{1,2}, DU Qin¹, PENG Shuang^{1,3}, LIN Xiangui¹, WANG Yiming^{1,2*}, LI Junying⁴, DAI Xun⁵, XIE Xinqiao⁵

(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; 3 Jiangsu Open University, Nanjing 210036, China; 4 Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Kunming 650021, China; 5 Hongta Tobacco (Group) Co. Ltd, Yuxi, Yunnan 653100, China)

Abstract: In this study, the changes in soil bacterial community structure, quantity and function were examined by a 3 a fertilization experiment using quantitative PCR and high-throughput sequencing techniques, which included three treatments: organic fertilizer (YJ), inorganic fertilizer (WJ), and the combined application of organic and inorganic fertilizer (YW). The results showed fertilization treatments caused the changes in soil physiochemical properties, specifically, WJ and YJ decreased soil pH, YJ significantly increased soil organic matter content, YW increased available nutrients and soil organic matter content while maintaining soil pH. Additionally, the quantity, community structure and function of soil bacteria also changed, the copy numbers of bacteria 16S rRNA gene in YJ and YW soils were significantly higher than in WJ soil, the alpha diversity of soil bacteria community in YW soil was the highest. Principal coordinate analysis and ANOSIM test further revealed soil pH had greatest influence on soil bacterial community structure. Moreover, some bacterial groups were obviously enriched, YW soil had significantly higher abundances of plant growth-promoting bacteria such as Gemmatimonadaceae, Micrococcaceae and Haliangiaceae. YJ soil had higher abundance of bacteria with nitrogen fixation or biocontrol functions such as Intrasporangiaceae, Xanthomonadaceae, Chitinophagaceae and Burkholderiaceae. Furthermore, YW and YJ increased the abundance of nitrogen-fixing bacteria Rhizobiaceae. Notably, the change in bacterial community structure may further influence bacterial community function, especially, YW can greatly enhance nitrification function of bacterial community. The above findings

①基金项目: 云南省烟草公司科技计划项目(2017YN06)和红塔烟草(集团)有限责任公司科技项目(S-6016010, S-6019001)资助。

* 通讯作者(ymwang@issas.ac.cn)

作者简介: 王珏(1995—), 女, 安徽马鞍山人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物方面研究。E-mail: wangjue@issas.ac.cn

provide a scientific basis for rational fertilization in tobacco production.

Key words: Fertilization; Tobacco-growing soil; High-throughput sequencing; Bacterial community

施肥是农业生产主要的措施之一,对土壤质量和可持续利用具有深远影响,长期施肥可改变土壤理化性质和生物活性,影响作物产量^[1]。微生物是土壤生物中最重要的组成部分,对环境变化十分敏感,是土壤环境质量的重要指标^[2]。近年来,国内外展开了诸多卓有成效的研究,主要集中于不同肥料处理如有机肥、有机无机肥配合施用对土壤肥力以及土壤微生物区系等方面的影响。有研究表明施用化肥可以增加 30%~50% 的粮食作物产量^[3],但是长期大量和过量施用化肥会引起土壤酸化板结、供肥能力下降等问题^[4-5]。与仅使用化肥相比,有机肥料、化肥和有机肥料配合施用有利于土壤团粒结构的形成,增加土壤透气性,增强保水保肥能力,协调水、气、热交换,促进土壤养分转化,从而刺激微生物的生长^[6-7]。有机肥施入土壤后,除了引起土壤微环境的变化外,同时又引入了一些外源微生物,打破了土著微生物动态平衡,最终造成整个土壤微生物区系的变化^[8]。因此,有机肥、有机肥与化肥的配合施用可以调控土壤微生物区系,是提升土壤质量和微生物多样性的重要途径。

烟草是我国重要的经济作物,我国烟草种植面积和烟叶产量均居世界首位^[9]。云南玉溪地处西南边陲,长期种植烟草,大多数烟区植烟历史超过百年,由于长期连作以及化学品(农药、除草剂)的大量投入,部分地区植烟土壤质量下降明显,已成为当地烟叶生产的主要障碍因子,制约烟叶产业的可持续发展。针对不同施肥措施对植烟土壤微生物的影响,有研究表明施用腐熟芝麻饼肥、腐殖酸或氨基酸可以明显增加烟田土壤根际细菌和放线菌的数量,对土壤真菌的数量影响较小^[10]。郭红祥等^[11]研究发现,施用菜籽饼和花生饼后烟田土壤中细菌、放线菌、好气性纤维分解菌和亚硝化细菌数量上升。张晓海等^[12]研究表明,施用菜籽饼不仅增加了烤烟根际土壤的细菌数量,而且显著提高了烟草生育中后期根际解磷细菌和解钾细菌的生物量。施用有机肥可以有效提高土壤中有益微生物的数量,降低或者控制土壤中病原微生物的数量,促进土壤微生物区系逐步向健康的状态转变,例如李想等^[13-14]研究发现施用 L-25 生物有机肥后,烟苗根际土壤中病原菌的数量从 10^7 cfu/g 下降至 10^6 cfu/g,烟草根系表面形成“微生物生物防御

层”,从而防止或减少病原菌的侵入。上述研究主要集中于施用有机肥对植烟土壤微生物数量的影响,对于土壤微生物多样性及功能变化的研究相对较少;此外,无机肥、有机肥和有机无机肥配合施用对土壤微生物群落结构、多样性及其功能的影响和差异也尚不明确。

目前,对植烟土壤响应施肥处理的研究主要集中在微生物群落组成和多样性,在功能层面上对微生物群落进行描述可以更深入地探讨施肥产生的影响。FAPROTAX 是一个进行细菌功能比对的数据库,不仅可对细菌进行具体的功能预测,还能对执行相关功能的菌群进行鉴定分类。FAPROTAX 在细菌群落研究中得到了较为广泛的应用^[15-16]。因此,本研究以云南玉溪种植烟草的土壤为研究对象,联合使用定量 PCR、高通量测序技术和 FAPROTAX 软件,分析不同肥料处理对盆栽植烟土壤理化性质和微生物群落结构、数量和功能的差异,探究各处理对土壤质量的影响,以期对烟叶种植的合理施肥和烟草生产的可持续发展提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 温室盆栽试验概况

供试土壤采自云南省玉溪市峨山县岔河乡河外村典型烟田,质地为紫色土,土壤的基本理化性质:pH 6.32,全氮 1.87 g/kg,全磷 1.22 g/kg,有效磷 22.73 mg/kg,速效钾 117.96 mg/kg。耕层土壤经风干过 0.50 mm 筛后装入试验盆钵内,每盆装 25 kg 风干土。

盆栽试验起始于 2015 年,采用春季种烟-冬季休闲的种植模式。设 3 种施肥处理,分别为:无机肥(WJ)、有机肥(YJ)和有机无机肥(YW),每种处理 3 次重复。其中 WJ 处理,基肥为烟草专用复混肥,追肥为烟草专用氮钾肥;YJ 处理中,基肥为有机肥,追肥为有机水溶肥;YW 处理中,基肥为烟草专用有机无机肥,追肥为有机无机氮钾肥。分别在移栽后 7~10、14~17、21~28 d 追肥,3 个时期追肥量的比例为 1:3:4。肥料养分含量比例及施肥量见表 1,其中有机肥和烟草专用有机无机肥是以发酵腐熟的油枯及生化黄腐酸钾制备。

2017 年 5 月 11 日移栽烟苗,8 月下旬试验结束,温室管理参照常规大田管理。

表 1 试验用肥料养分含量及其施肥量
Table 1 Nutrient contents and application rates of fertilizers in greenhouse experiment

肥料	WJ	YJ	YW
烟草专用复混肥(N:P ₂ O ₅ :K ₂ O=10:10:25)	300 kg/hm ²		
烟草专用氮钾肥(N:P ₂ O ₅ :K ₂ O=10:0:30)	825 kg/hm ²		
有机肥(N:P ₂ O ₅ :K ₂ O=4:2:2)		1 200 kg/hm ²	
有机水溶肥(N:P ₂ O ₅ :K ₂ O=5:0:17)		1 200 kg/hm ²	
烟草专用有机无机肥(N:P ₂ O ₅ :K ₂ O=7:6:17)			600 kg/hm ²
有机无机氮钾肥(N:P ₂ O ₅ :K ₂ O=8.7:0:30.5)			750 kg/hm ²
总养分投入比 N:P:K	7.5:2:11.5	7.2:1.6:15.2	7.15:2.4:22.05

1.2 试验样品采集

于 2017 年 7 月 25 日烟草成熟期采集土壤样品。每盆多点取样混合作为 1 个耕层土壤样品,充分混匀。所有样品去除植物根系后风干过 2 mm 筛混匀,一部分风干后用于土壤理化性质的测定,另一部分置于 -80 °C 冰箱,用于土壤 DNA 提取。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 土壤理化性质测定

土壤 pH 按土水比 1:2.5(质量体积比)充分混合后用 pH 计测定;土壤铵态氮(NH₄⁺-N)采用纳氏试剂比色法测定,硝态氮(NO₃⁻-N)采用紫外分光光度法测定;有效磷(AP)采用 0.50 mol/L 碳酸氢钠浸提,钼锑抗比色法测定;全钾(TK)、速效钾(AK)和缓效钾(SLK)分别用 NaOH 熔融、1 mol/L 乙酸铵浸提、1 mol/L 热硝酸浸提,原子吸收分光光度法测定;有机质(OM)采用重铬酸钾容量法测定。具体方法参考鲁如坤^[17]。

1.3.2 土壤 DNA 提取及实时荧光定量 PCR

称取约 0.5 g 新鲜土壤,土壤总 DNA 使用 Fast DNA Spin Kit for Soil(MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)试剂盒提取,同时用核酸定量仪(NanoDrop ND-1000)检测提取 DNA 的浓度和纯度,提取完成后,于 -20 °C 冰箱保存备用。

采用实时荧光定量 PCR 法测定细菌 16S rRNA 基因丰度,采用引物 338F(5'-ACTCCTA CGGGAGGCAGCAG-3')和 806R(5'-GGACTACHV GGGTWTCTAAT-3')扩增细菌 16S rRNA 基因。测定标准质粒(内参)浓度并进行梯度稀释制备标准曲线,用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, CA, USA)进行测定,根据标准曲线中的基因拷贝数和 Ct 值计算样品中的基因拷贝数。反应体系为:SYBR[®] Premix Ex Taq II (ThiRNaseH Plus)10 μl,上下游引物(10 μmol/L)各 0.20 μl, DNA 模板 2.0 μl, ddH₂O 7.6 μl。16S rRNA 反应条件为:95 °C 3 min; 95 °C 20 s, 56 °C 45 s, 72 °C 30 s, 共 34 个循环。

退火延伸时检测荧光信号。

1.3.3 高通量测序分析

高通量测序委托北京诺禾致源生物公司进行,具体方法如下:①采用 CTAB 或 SDS 方法提取 DNA,之后利用琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 的纯度和浓度,无菌水稀释样本至 1 ng/μl;②以稀释后的 DNA 为模板,利用通用引物 515F-806R 对细菌 16S rRNA 基因的 V4 区进行扩增,在 515F 的前端插入 barcode 序列以区分各样本。PCR 反应体系为 30 μl,反应条件为:98 °C 1 min, 30 次循环(98 °C 10 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 5 min。PCR 产物使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测,据其浓度进行等量混样,充分混匀后使用 GeneJET[™] PCR Purification kit 试剂盒(Thermo Scientific, USA)对 PCR 产物进行纯化;③使用 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 试剂盒(Thermo Fisher, MA, USA)进行文库构建,构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测合格后,利用 IonS5TMXL 测序仪(Thermo Fisher, MA, USA)上机测序。

1.4 数据处理与分析

土壤理化性质、细菌 16S rRNA 基因拷贝数的多重比较、方差分析和相关性分析用 SPSS 24.0 软件完成,相关性分析采用 Pearson 双尾检验,平均值多重比较采用 Duncan 检验法进行显著性检验(统计水准均为 $P < 0.05$),并采用 Origin 8.6 和 Adobe Illustrator CC 2019 软件进行绘图。

使用 QIIME 1.9.1 按以下步骤进行高通量测序数据处理分析:①切除引物和低质量序列并根据 barcode 序列区分各样本数据;②基于 SILVA^[18]数据库去除嵌合体;③得到的高质量序列以 97% 相似度聚类成为 OTUs(operational taxonomic units, 操作分类单元);④进行物种注释(设定阈值为 0.8 ~ 1),将未注释到门水平及注释为古菌的序列删除后,所有样品随机抽取 52 000 条序列进行后续分析。计算细菌

Chao1、Shannon、Simpson、ACE 指数, 使用 R3.6.1 软件 agricolae 包的 Tukey 检验和 wilcox 检验进行组间差异分析, 基于 Bray-Curtis、Weighted UniFrac、Unweighted UniFrac 距离的主坐标分析(PCoA)使用 WGCNA、stats 和 ggplot2 包, Mantel test、ANOSIM 分析和典范对应分析均使用 vegan 包进行, Pearson 相关性分析采用 psych 和 pheatmap 包完成相关系数值的显著性检验及函数可视化, 功能预测使用 FAPROTAX 软件进行。

表 2 不同施肥处理下土壤主要化学性质
Table 2 Main soil chemical properties under different fertilization treatments

处理	pH	铵态氮(mg/kg)	硝态氮(mg/kg)	有效磷(mg/kg)	速效钾(mg/kg)	缓效钾(mg/kg)	有机质(g/kg)
YJ	5.17 ± 0.08 b	5.45 ± 0.29 b	46.48 ± 10.27 a	74.74 ± 2.10 a	335.58 ± 44.37 b	362.68 ± 11.24 b	56.50 ± 9.48 a
YW	6.37 ± 0.09 a	6.00 ± 0.35 b	24.26 ± 10.39 a	79.70 ± 5.46 a	785.49 ± 113.48 a	569.67 ± 28.70 a	43.59 ± 3.95 b
WJ	4.82 ± 0.14 c	20.39 ± 11.84 a	23.46 ± 10.09 a	94.52 ± 16.19 a	735.33 ± 207.72 a	548.45 ± 25.14 a	35.79 ± 0.66 b

注: 同列数据小写字母不同表示处理间差异达 $P < 0.05$ 显著水平, 下表同。

YJ 处理有机质含量的显著增加, 可能是因为本试验中的有机肥是以发酵腐熟后的油枯及黄腐酸钾作为有机原料制备的, 其中相当部分的有机物质分解缓慢, 施用后导致土壤有机质积累, 库存较高; 此外, 黄腐酸钾和油枯中含有小分子有机酸, 可能促进烟株根系生长并影响微生物活动: 分泌更多根系分泌物提高外源有机碳输入量^[19-20]、微生物活动的增强导致土壤微生物量碳增加, 从而提升根围土壤有机质含量^[21]。YJ 处理铵态氮、速效钾、缓效钾等养分均显著低于 YW 和 WJ 处理, 这是因为无机肥料养分释放快, 短时间内可迅速增加土壤速效养分含量, 提高土壤供肥能力; 而有机肥养分释放慢, 虽可改善土壤养分的库容, 提高土壤供肥容量, 但速效养分较少; 有机无机肥配施, 速效和缓效养分互补, 可提高作物对肥料养分的利用率。此外, YJ 和 YW 处理土壤中的硝态氮和铵态氮比值均高于 WJ 处理, 更能满足烟草喜硝的特点。

2.2 不同施肥处理对细菌群落数量的影响

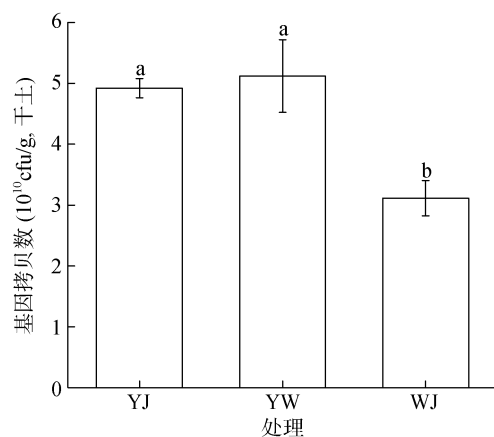
3 种不同肥料施用 3 a 后土壤中细菌 16S rRNA 基因数量见图 1, 与 WJ 处理相比, YW 和 YJ 处理均显著增加了土壤中的细菌数量, 分别增加了 58.20% 和 64.63%。相关性分析(表 3)表明, 土壤细菌 16S rRNA 基因拷贝数与土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 呈显著负相关, 与土壤 pH、有机质含量显著正相关, 说明肥料施用后引起的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、pH 和有机质含量的变化, 可能是导致施肥土壤中细菌数量差异的主要原因。多

2 结果与讨论

2.1 不同施肥处理对植烟土壤化学性质的影响

经过连续 3 a 的施肥, 与 2015 年本底土和 YW 处理相比, WJ 和 YJ 处理均明显降低了土壤 pH, WJ 处理的土壤 pH 降低幅度最大, 其次为 YJ 处理(表 2)。与 WJ 处理相比, YJ 处理土壤中的铵态氮、速效钾和缓效钾含量显著较低, 有机质含量显著较高; 而 YW 处理除铵态氮含量显著较低外, 其他养分含量与 WJ 处理无显著差异。

项研究证明, 有机物的添加(农作物残体、绿肥)对微生物数量的影响较大^[22]。土壤有机质与农业或自然生态系统中的土壤微生物生物量之间存在着显著正相关关系^[23], 有机肥料的添加, 为细菌生长提供了充足的碳、氮源, 促进了细菌繁殖^[24-25]。由于连续施用无机肥显著降低了土壤 pH(表 2), 而细菌数量与土壤酸碱度高度相关^[26], 较低的 pH 环境不利于细菌生长繁殖^[27], 这可能是本研究 WJ 处理土壤中的细菌 16S rRNA 拷贝数显著较低的原因。



(图中小写字母不同表示处理间差异达 $P < 0.05$ 显著水平)

图 1 不同施肥处理土壤 16S rRNA 基因拷贝数

Fig.1 16S rRNA gene copies in soils under different fertilization treatments

2.3 不同施肥处理对细菌群落多样性的影响

土壤细菌对环境条件的变化十分敏感, 长期施肥会显著影响微生物群落的多样性和结构^[28]。通过高

表 3 16S rRNA 基因拷贝数与土壤理化性质的相关性
Table 3 Correlations between 16S rRNA gene copies and soil properties

指标	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	AP	AK	SLK	TK	pH	OM
<i>r</i>	-0.733*	0.533	-0.594	0.083	-0.200	-0.150	0.787*	0.733*
<i>P</i>	0.025	0.139	0.092	0.831	0.606	0.700	0.012	0.025

注：AP：有效磷；AK：速效钾；SLK：缓效钾；TK：全钾；OM：有机质；NH₄⁺-N：铵态氮；NO₃⁻-N：硝态氮。*表示相关性达 *P*<0.05 显著水平。

高通量测序结果进行质控、降噪，共获得 723 037 条高质量序列，平均每个样本 80 337 条。稀释曲线分析表明，在 52 000 个随机选择的细菌序列中，曲线接近饱和和稳

定，表明测序深度符合下游分析要求。不同处理土壤的细菌群落 α 多样性指数见表 4，3 个处理中，YW 处理土壤中的细菌群落 α 多样性指数显著较高，而 YJ 和 WJ 处理之间无显著差异。说明 YW 处理能够提高土壤中细菌的丰富度和多样性。基于 Bray-Curtis dissimilarity、Weighted UniFrac distance 和 Unweighted UniFrac distance 3 种距离矩阵进行主坐标分析，结果如图 2 所示，不同施肥处理下细菌群落结构明显分异(图 2A~2C)。ANOSIM 检验表明，3 种距离矩阵下各处理的组内差异均显著低于组间差异(图 2D~2F)，表明不同施肥处理下的细菌群落结构差异显著。

表 4 不同施肥处理土壤细菌群落的 α 多样性指数
Table 4 Alpha diversity indices of soil bacterial communities under different fertilization treatments

处理	ACE 指数	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
YJ	1 504.5 ± 28.58 ab	1 535.86 ± 48.48 b	7.63 ± 0.3 b	0.97 ± 0.01 b
YW	1 587.59 ± 56.27 a	1 648.58 ± 69.64 a	8.62 ± 0.23 a	0.99 ± 0.00 a
WJ	1 441.16 ± 96.20 b	1 458.70 ± 81.80 b	7.85 ± 0.29 b	0.98 ± 0.01 b

注：表中数据为 3 个样点的平均值 ± 标准差。

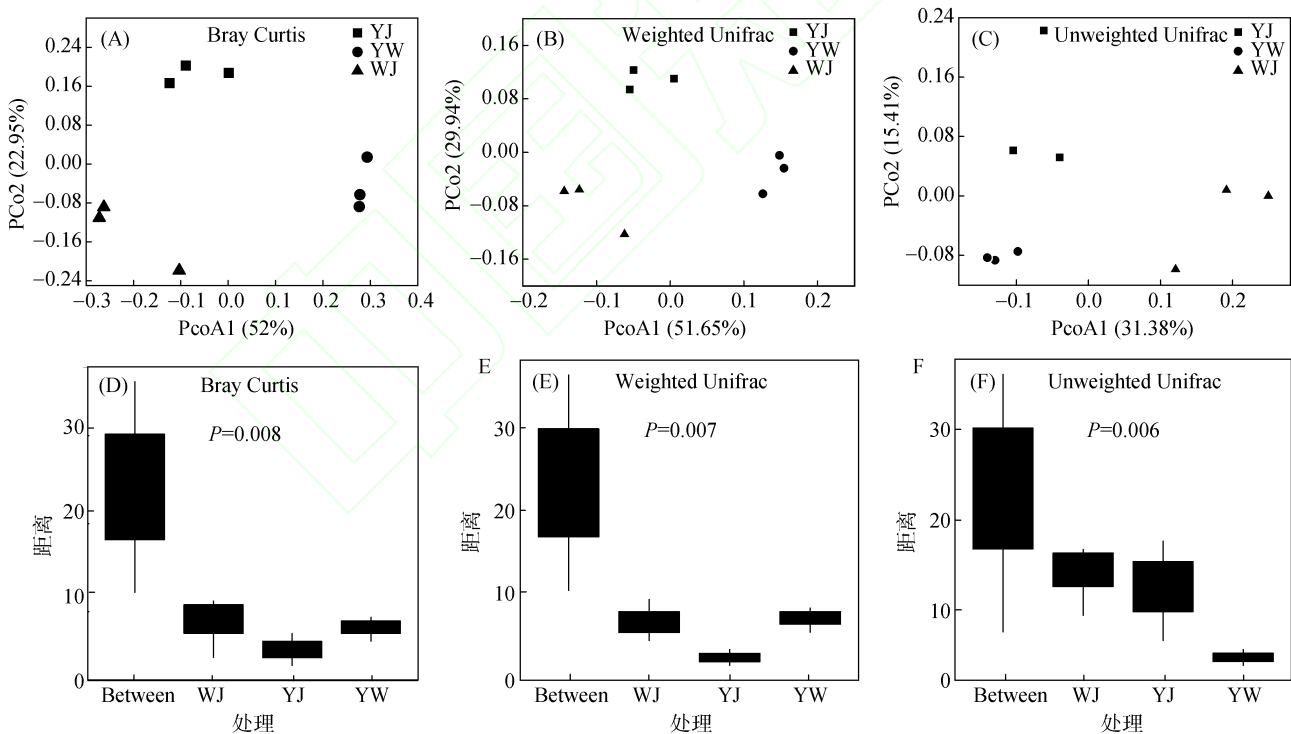


图 2 基于 Bray-Curtis、Weighted UniFrac、Unweighted UniFrac 距离矩阵的 PCoA 分析和 ANOSIM 检验

Fig.2 Principal co-ordinates analysis and ANOSIM test based on Bray-Curtis, weighted UniFrac and unweighted UniFrac distance matrices of soil bacterial community under different fertilization treatments

分别在 OTU 水平、门水平和科水平上，采用 Mantel test 检验土壤细菌群落结构和土壤理化性质之间的相关性(表 5)，结果表明土壤 pH 在各分类水平上均与土壤细菌群落结构高度相关(*P*< 0.001)，在 OTU 水平上 NH₄⁺-N 含量与土壤细菌群落结构显著相关(*r* =

0.391, *P* = 0.005)。进一步采用 CCA 分析土壤理化性质对细菌群落组成的影响(图 3)。结果显示，在 OTU 水平上，NH₄⁺-N、AP 和 pH 对第一轴贡献率较高，而 NO₃⁻-N、AK、SLK、TK 和 OM 对第二轴贡献率较高，且 pH 和 NH₄⁺-N 对施肥土壤细菌群落影响显著(图 3)。

在门和科水平上, pH 同样是显著影响土壤细菌群落结构的关键环境因子。有研究表明, 不同的肥料类型会改变土壤的物理和化学性质, 如土壤通气状况、pH、水分和养分固持能力等, 进而影响微生物群落结构^[28-30], 本研究结果与上述研究结论一致。连续施用无机肥会导致土壤酸化, 而土壤酸化会进一步引发一系列生物化学反应, 尤其是强烈影响微生物活动, 最终

导致微生物区系多样性失衡^[31]。与施用有机肥牛粪相比, 施用无机肥可降低土壤微生物区系种群功能多样性^[32]。而有机物料能增进土壤微生物多样性, 微生物多样性的增加又可改进对土壤的能源和营养物质的利用, 例如 Peacock 等^[33]研究表明, 长期施用牛粪会促进作物根系分泌物和土壤中可溶性有机碳积累, 导致微生物生物量的增加和群落结构的变化。

表 5 土壤细菌群落结构与理化性质的 Mantel 检验
Table 5 Mantel test determining relations between soil properties and bacterial community structures

水平		NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	AP	AK	SLK	TK	pH	SOM
OTU	R	0.391**	0.082	0.145	0.119	0.141	0.021	0.731**	0.096
	P	0.005	0.276	0.175	0.192	0.164	0.539	0.001	0.241
Phylum	R	0.187	0.071	0.012	0.111	0.081	0.094	0.908**	0.114
	P	0.104	0.604	0.466	0.214	0.280	0.229	0.001	0.180
Family	R	0.144	0.105	0.033	0.123	0.114	0.115	0.901**	0.081
	P	0.179	0.709	0.408	0.179	0.216	0.203	0.001	0.216

注: **表示相关性达 $P < 0.01$ 显著水平。

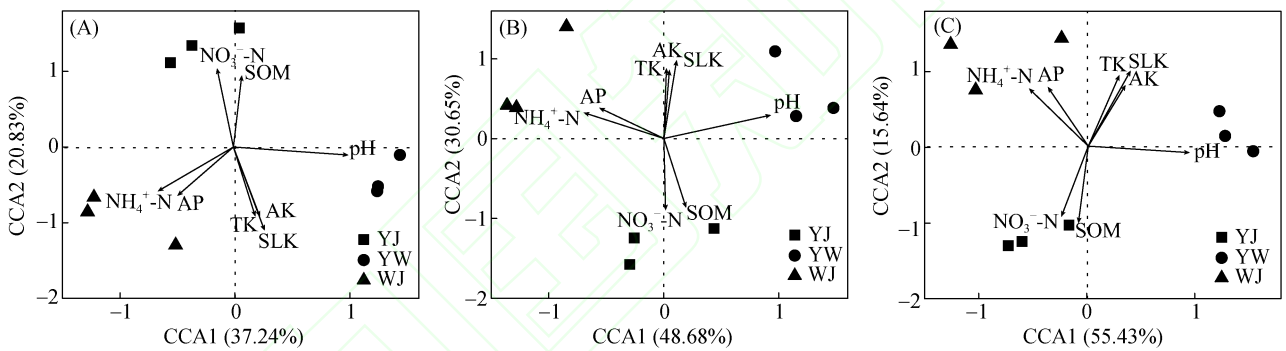


图 3 土壤细菌群落与土壤因子的典范对应分析

Fig.3 Canonical correspondence analysis (CCA) determining effects of soil factors on soil bacterial community structures

2.4 不同施肥处理对细菌群落物种组成的影响

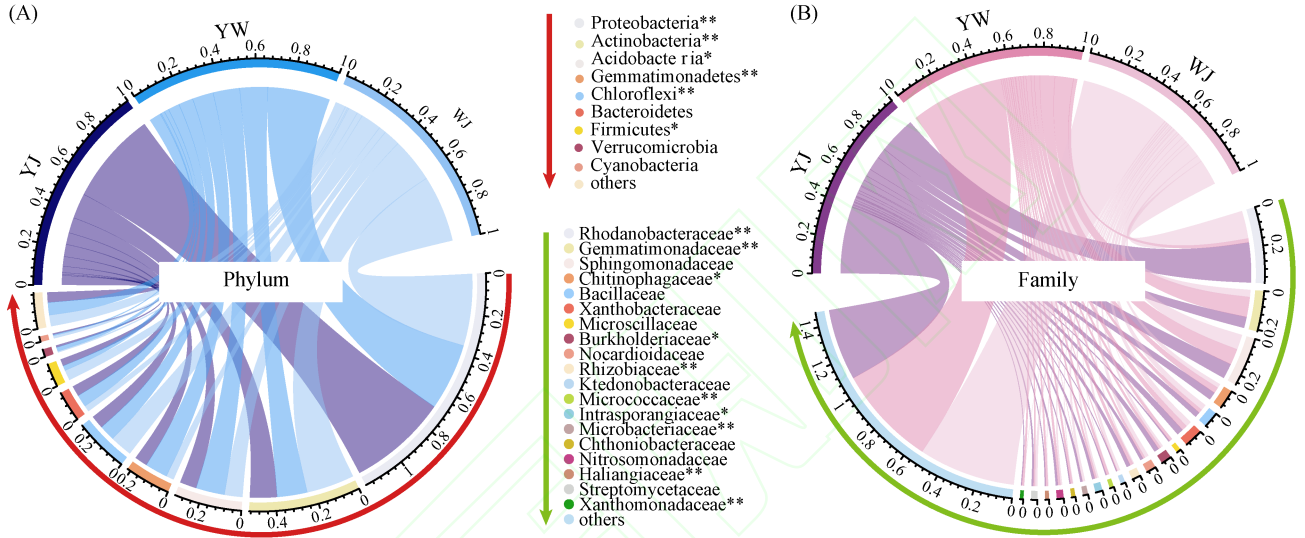
将所获的高质量序列在 97% 相似性水平上进行聚类, 共得到 2 661 个 OTUs, 代表序列经物种注释后归属 32 个门、50 个纲、112 个目、187 个科和 360 个属。在全部样品中, Proteobacteria (平均相对丰度为 39.9%) 是最丰富的门, 其次是 Actinobacteria (17.6%)、Acidobacteria (10.6%)、Gemmatimonadetes (7.19%) 和 Chloroflexi (8.57%), 这 5 个优势菌门的累计相对丰度为 83.8% (图 4A), 与植烟黄壤中的优势菌门类似^[34]。上述优势菌门的相对丰度在不同处理土壤中存在显著性差异, YJ 处理土壤中 Proteobacteria 显著较高, 分别比 YW 和 WJ 处理高 16.20% 和 13.86%; 可能是因为大量有机质的投入有利于富营养微生物群落的富集^[35]。YW 处理的 Acidobacteria 和 Gemmatimonadetes 均显著高于其他处理, 而 Actinobacteria、Chloroflexi 和 Firmicutes

的相对丰度在 WJ 处理中最高。上述结果表明, 与 WJ 处理相比, YJ 处理显著增加了土壤中的变形菌门相对丰度, 而 YW 处理则显著增加了 Acidobacteria 和 Gemmatimonadetes 相对丰度, YJ 和 YW 处理均显著降低了 Actinobacteria、Chloroflexi 和 Firmicutes 的相对丰度。

在科水平上 (图 4B), Rhodanobacteraceae、Gemmatimonadaceae 和 Sphingomonadaceae 是植烟土壤细菌群落中平均相对丰度最高的 3 个科, 分别隶属于 γ -Proteobacteria、Gemmatimonadetes 和 α -Proteobacteria。通过单因素方差分析, 确定响应不同肥料处理的 40 个组间差异物种, 并对差异物种与土壤理化因子进行相关性分析 (图 5), 结果表明: 连续 3 a 施用 YJ 肥料, 显著增加了土壤中 Intrasporangiaceae、Burkholderiaceae、Chitinophagaceae 和 Xanthomonadaceae 的相对丰度, 上述细菌均与土壤中

的有机质和硝态氮含量正相关。Intrasporangiaceae 对重金属有一定的耐受性^[36], Burkholderiaceae 是固氮菌^[37], 能够与植物寄主共生固氮, 而 Xanthomonadaceae^[38]和 Chitinophagaceae^[39]是植物病害生防细菌, 可以产生许多具有重要生物活性的次生代谢产物从而抑制病原菌的生长。YW 处理显著降低了 Rhodanobacteraceae、Microbacteriaceae 的相对丰度, 显著增加了 Gemmatimonadaceae、Micrococcaceae 和 Haliangiaceae 的相对丰度, 这 3 种相对丰度增加的

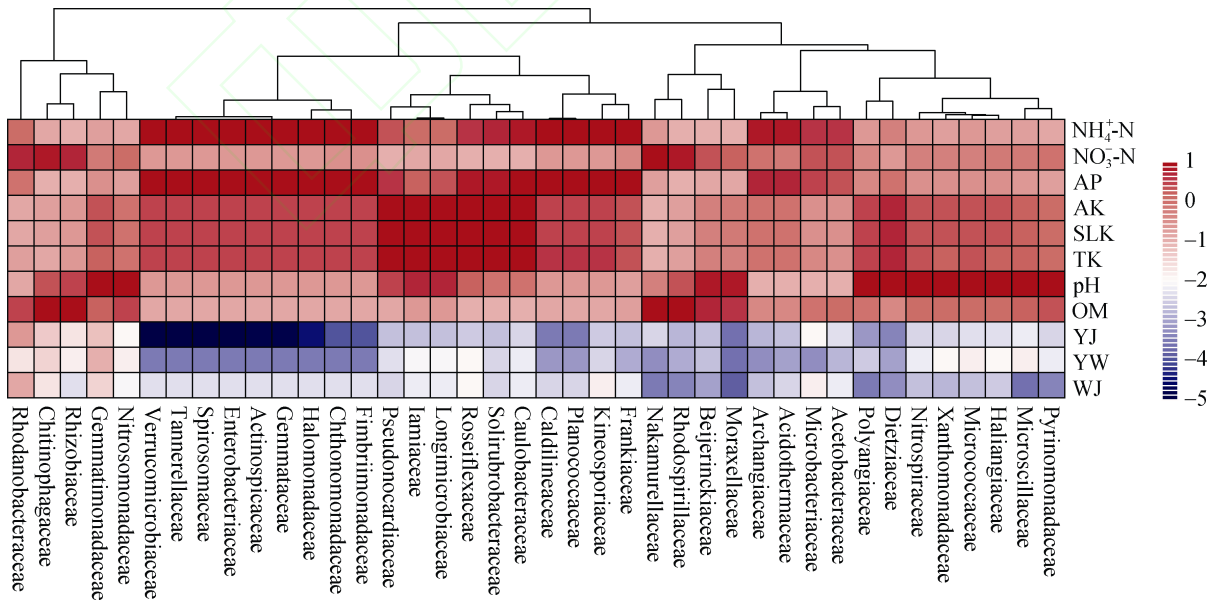
细菌均与土壤 pH 呈正相关; Gemmatimonadaceae^[40]、Micrococcaceae^[41]和 Haliangiaceae^[42-43]被证明是植物促生菌(PGPR), 能够产生 GA 和 IAA 并诱导根系生长。此外, YJ 和 YW 处理均显著增加了 Rhizobiaceae 的相对丰度, 且与土壤中的有机质和硝态氮含量正相关。Rhizobiaceae 是固氮菌^[44], 能附着在根上并有效地定殖于根表, 与植物寄主共生固氮, 是促进植物生长的益生菌。综上, 3 种施肥处理中, YJ 和 YW 处理能够增加有益菌的相对丰度, 更有利于烟草的生长。



(样本与物种之间的关系, 上半圆指示不同处理, 下半圆指示不同物种, 条带长度表示在相应处理中各优势门、科的相对丰度)

图 4 不同施肥处理土壤门和科分类水平上细菌物种相对丰度

Fig. 4 Relative abundances of soil bacteria communities at phylum and family levels under different fertilization treatments



(下方的 YJ、YW 和 WJ 行表示的是 3 个处理土壤中各差异菌的平均相对丰度, 其余各行表示各差异菌与土壤理化性质的相关系数(0 < r < 1))

图 5 土壤理化性质与科水平差异菌相关性分析

Fig.5 Correlations between soil properties and bacterial families

2.5 不同施肥处理对细菌群落功能的影响

使用 FAPROTAX 对微生物细菌群落进行功能预测,从 35 个功能中筛选出处理间有显著差异的 8 项功能进行分析(表 6),结果表明:与 YJ 和 WJ 处理相比, YW 处理中需氧化能异养显著降低。相关性分析表明,需氧化能异养功能与可进行光合作用的自养营养微生物 Gemmatimonadetes 相对丰度呈负相关($r=-0.817$, $P=0.048$)^[45]。本研究中 Gemmatimonadetes 在有机无机处理中显著升高(图 4A),暗示土壤中的化能自养微生物与异养微生物可能存在着生态位的竞争作用。

表 6 不同处理微生物菌群功能预测

Table 6 Function prediction of soil microbial communities under different treatments

功能	YJ	YW	WJ
硝化功能		**	
硫酸盐呼吸		*	
硝酸盐氨化作用			**
木聚糖酶解	*		
需氧化能异养	*		
芳烃降解			**
脂肪族非甲烷烃降解		**	
乙酸还原			**

注: *, **分别表示相关性达 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 显著水平。

本研究发现在 3 组施肥处理中, YW 处理细菌群落的硝化功能显著高于 YJ 和 WJ 处理,可能是

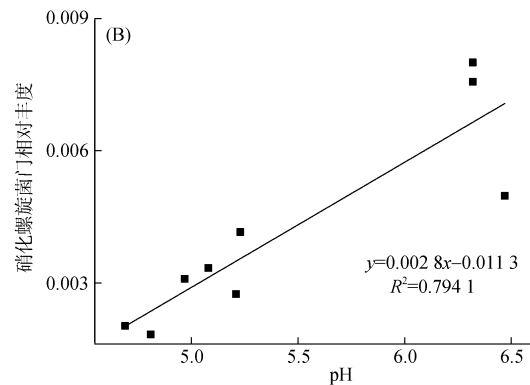
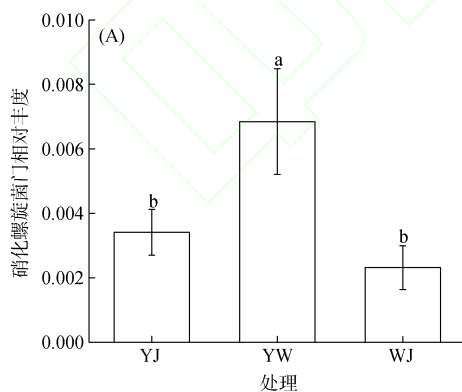


图 6 不同处理硝化螺旋菌门相对丰度及 pH 相关性

Fig.6 Correlation between relative abundance of Nitrospira and pH under different treatments

参考文献:

- [1] Zhong W H, Gu T, Wang W, et al. The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity[J]. Plant and Soil, 2010, 326(1/2): 511–522.
- [2] Insam H, Hutchinson T C, Reber H H. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1996, 28(4/5): 691–694.

由于执行该功能的关键物种 Nitrospira 在 YW 处理中相对丰度显著高于 YJ 和 WJ 处理(图 6A)。相关性分析表明,土壤 Nitrospira 的相对丰度与土壤 pH 显著正相关(图 6B),因此,推测 YJ 和 WJ 处理导致土壤 pH 明显降低,进而减少了该菌的相对丰度,影响了土壤微生物的硝化功能。长期连作土壤中, WJ 处理一方面降低了植烟土壤 Burkholderiaceae、Rhizobiaceae 等促进固氮作用的细菌丰度(图 4、图 5);另一方面会导致土壤严重酸化,减少硝化作用关键物种数量,抑制硝化细菌的活性,进而引发土壤微生物硝化功能降低;而施用 YW 肥,土壤硝化功能保持较高的状态,更能满足烟草喜硝的特点。

3 结论

长期施用不同的烟草肥料会对土壤理化性质和细菌群落造成明显的影响。长期施用有机肥有助于提高土壤有机质含量,增加细菌数量;有机无机肥配施有利于维持土壤 pH 的稳定,还可提高土壤速效养分和有机质含量,增加土壤中的细菌数量和细菌群落的多样性。施用有机肥或有机无机肥配施均可以提高 Gemmatimonadaceae、Rhizobiaceae 和 Micrococcaceae 等植物促生菌的丰度;而连续施用无机肥则导致土壤酸化,降低土壤细菌数量和细菌群落的硝化功能。综上,建议云南紫色土区域烟草施肥采用无机肥和有机肥配施,更有利于维持植烟土壤质量的稳定和微生物区系的健康。

- [3] Stewart W M, Dibb D W, Johnston A E, et al. The contribution of commercial fertilizer nutrients to food production[J]. Agronomy Journal, 2005, 97(1): 1–6.
- [4] 黄国勤, 王兴祥, 钱海燕, 等. 施用化肥对农业生态环境的负面影响及对策[J]. 生态环境, 2004, 13(4): 656–660.
- [5] 张福锁, 王激清, 张卫峰, 等. 中国主要粮食作物肥料利用率现状与提高途径[J]. 土壤学报, 2008, 45(5): 915–924.

- [6] Miao Y X, Stewart B A, Zhang F S. Long-term experiments for sustainable nutrient management in China. A review[J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2011, 31(2): 397–414.
- [7] Zhang S T, Song X N, Li N, et al. Influence of high-carbon basal fertiliser on the structure and composition of a soil microbial community under tobacco cultivation[J]. *Research in Microbiology*, 2018, 169(2): 115–126.
- [8] Li W T, Wu M, Liu M, et al. Responses of soil enzyme activities and microbial community composition to moisture regimes in paddy soils under long-term fertilization practices[J]. *Pedosphere*, 2018, 28(2): 323–331.
- [9] 苏贤坤, 张晓海, 廖德智. 烟草综合利用现状及其前景[J]. *贵州农业科学*, 2006, 34(5): 120–123.
- [10] 彭智良, 黄元炯, 刘国顺, 等. 不同有机肥对烟田土壤微生物以及烟叶品质和产量的影响[J]. *中国烟草学报*, 2009, 15(2): 41–45.
- [11] 郭红祥, 刘卫群, 姜占省. 施用饼肥对烤烟根系土壤微生物的影响[J]. *河南农业大学学报*, 2002, 36(4): 344–347.
- [12] 张晓海, 杨春江, 王绍坤, 等. 烤烟施用菜籽饼后根际微生物数量变化研究[J]. *云南农业大学学报*, 2003, 18(1): 14–19.
- [13] 李想, 刘艳霞, 陆宁, 等. 综合生物防控烟草青枯病及其对土壤微生物群落结构的影响[J]. *土壤学报*, 2017, 54(1): 216–226.
- [14] 滕桂香, 邱慧珍, 张春红, 等. 微生物有机肥对烤烟育苗、产量和品质的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2011, 19(6): 1255–1260.
- [15] Ma J, Liu H, Zhang C, et al. Joint response of chemistry and functional microbial community to oxygenation of the reductive confined aquifer[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 720: 137587.
- [16] 赵文慧, 马垒, 徐基胜, 等. 秸秆与木本泥炭短期施用对潮土有机质及微生物群落组成和功能的影响[J]. *土壤学报*, 2020, 57(1): 153–164.
- [17] 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.
- [18] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590–D596.
- [19] 张伟明, 孟军, 王嘉宇, 等. 生物炭对水稻根系形态与生理特性及产量的影响[J]. *作物学报*, 2013, 39(8): 1445–1451.
- [20] 应多, 赵熙君, 张旭辉, 等. 添加玉米秸秆重金属污染对水稻土有机碳矿化的影响[J]. *土壤*, 2020, 52(2): 340–347.
- [21] 李典鹏, 王辉, 孙涛, 等. 机械压实对新疆绿洲农田土壤微生物活性及碳排放的影响[J]. *农业工程学报*, 2018, 34(20): 124–131.
- [22] N'Dayegamiye A, Tran T S. Effects of green manures on soil organic matter and wheat yields and N nutrition[J]. *Canadian Journal of Soil Science*, 2001, 81(4): 371–382.
- [23] 第 19 届国际土壤学大会重点论文摘要选译[J]. *土壤*, 2010, 42(5): 696–799.
- [24] Demoling F, Figueroa D, Bååth E. Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(10): 2485–2495.
- [25] Sradnick A, Murugan R, Oltmanns M, et al. Changes in functional diversity of the soil microbial community in a heterogeneous sandy soil after long-term fertilization with cattle manure and mineral fertilizer[J]. *Applied Soil Ecology*, 2013, 63: 23–28.
- [26] Feng Y Z, Grogan P, Caporaso J G, et al. pH is a good predictor of the distribution of anoxygenic purple phototrophic bacteria in Arctic soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 74: 193–200.
- [27] Bartram A K, Jiang X P, Lynch M D J, et al. Exploring links between pH and bacterial community composition in soils from the Craibstone Experimental Farm[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 87(2): 403–415.
- [28] Zimmerman A R. Abiotic and microbial oxidation of laboratory-produced black carbon (biochar)[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(4): 1295–1301.
- [29] Jindo K, Hernández T, García C, et al. Influence of stability and origin of organic amendments on humification in semiarid soils[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2011, 75(6): 2178–2187.
- [30] Chintala R, Mollinedo J, Schumacher T E, et al. Effect of biochar on chemical properties of acidic soil[J]. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2014, 60(3): 393–404.
- [31] 徐仁扣. 土壤酸化及其调控研究进展[J]. *土壤*, 2015, 47(2): 238–244.
- [32] Ozlu E, Kumar S. Response of soil organic carbon, pH, electrical conductivity, and water stable aggregates to long-term annual manure and inorganic fertilizer[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2018: 1243–1251.
- [33] Peacock A D, Mullen M D, Ringelberg D B, et al. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(7/8): 1011–1019.
- [34] 陈懿, 吴春, 李彩斌, 等. 炭基肥对植烟黄壤细菌、真菌群落结构和多样性的影响[J]. *微生物学报*, 2020, 60(4): 653–666.
- [35] Manzoni S, Porporato A. Soil carbon and nitrogen mineralization: Theory and models across scales[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(7): 1355–1379.
- [36] 丁苏丽, 张祁炅, 董俊, 等. 深港红树林沉积物微生物群落多样性及其与重金属的关系[J]. *生态学杂志*, 2018, 37(10): 3018–3030.
- [37] 成艳红, 黄欠如, 武琳, 等. 红壤旱地一株自生固氮菌的筛选鉴定及其固氮能力评估[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(9): 100–106.
- [38] Mhedbi-Hajri N, Jacques M A, Koebnik R. Adhesion mechanisms of plant-pathogenic xanthomonadaceae//Linke D, Goldman A. Bacterial adhesion: Chemistry, biology and physics[M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 2011: 71–89.

- [39] Choi J, Cha S, Chhetri G, et al. *Edaphocola aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Chitinophagaceae isolated from wetland soil in South Korea[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2019, 112(5): 687–694.
- [40] Jaiswal A K, Graber E R, Elad Y, et al. Biochar as a management tool for soilborne diseases affecting early stage nursery seedling production[J]. *Crop Protection*, 2019, 120: 34–42.
- [41] Hong S H, Ham S Y, Kim J S, et al. Application of sodium polyacrylate and plant growth-promoting bacterium, Micrococcaceae HW-2, on the growth of plants cultivated in the rooftop[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 113: 297–303.
- [42] Xiao M, Zhou X K, Chen X, et al. *Lysobacter tabacisoli* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Nicotiana tabacum* L.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(7): 1875–1880.
- [43] Hallmann J, Rodríguez-Kábana R, Klopper J W. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31(4): 551–560.
- [44] Spaink H P, Kondorosi A, Hooykaas P J J. The rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria[M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1998: 155–172.
- [45] Butterfield N J. Proterozoic photosynthesis - a critical review[J]. *Palaeontology*, 2015, 58: 1–52.