

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54 (3) :319 - 329; 4 March 2014

ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.03.009

长期施肥土壤微生物群落的剖面变化及其与土壤性质的关系

李晨华¹, 张彩霞^{2,3}, 唐立松^{1*}, 熊正琴², 王保战³, 贾仲君³, 李彦¹

¹荒漠与绿洲生态国家重点实验室, 中国科学院新疆生态与地理研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011

²南京农业大学农业资源与生态环境研究所, 江苏 南京 210095

³中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 210008

摘要:【目的】认识不同施肥模式对土壤微生物群落的长期影响及其与土壤理化属性的联系。【方法】利用新一代高通量测序技术, 研究绿洲农田 20 年单施化肥 (N 300 kg/hm²、P₂O₅ 150 kg/hm² 与 K₂O 60 kg/hm²) 与化肥配施秸秆 (同量的 N 与 P 肥配施 5.4 t 秸秆) 对土壤剖面 (0 - 300 cm) 微生物群落结构的影响。【结果】放线菌与 α -变形菌为土壤表层 (0 - 20 cm) 的优势类群。随土壤剖面深度的增加, 放线菌相对丰度减少, 而变形菌, 特别是 γ -变形菌与 β -变形菌相对丰度增加, 逐渐成为深层 (20 - 300 cm) 土壤中的优势类群。长期施肥对整个土壤剖面的微生物群落结构均有显著影响, 并且明显提高了 0 - 40 cm 土层中氨氧化古菌的相对丰度。此外, 农田管理模式如灌溉可能是氨氧化细菌在土壤垂直剖面的重要驱动因素。统计分析表明土壤全氮含量对表层土壤中微生物群落结构的影响最大, 而有机碳含量则是影响深层土壤微生物群落的最重要因子。【结论】长期施肥改变了土壤剖面碳源与氮源的可利用量, 导致了施肥处理间土壤微生物群落结构的差异, 特别在剖面深层更为明显。

关键词: 土壤剖面, 微生物群落, 高通量测序, 长期施肥, 绿洲农田

中图分类号: Q143; Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2014) 03-0319-11

土壤微生物在维持生态系统结构与功能稳定过程中发挥着重要作用。农业生态系统中, 不同管理方式通过影响土壤属性, 改变微生物群落结构及其生理生态功能, 进而对土壤质量甚至是生态环境安全产生影响。研究表明^[1-2], 大量氮肥的施用通常导致土壤微生物群落多样性降低、硝化微生物群落结构趋向单一、土壤酸化增强, 并造成有机碳 (SOC) 损失, 进而引起土壤质量下降与生态风险增加等一系列环境后果; 而化肥有机肥配

施的农田管理模式, 通常会使得土壤微生物群落结构趋于优化, SOC 得以保持与增长, 有利于土壤质量的维持与提高^[3-4]。对于农业生态系统而言, 各种管理模式使得不同质与量的物料进入表层土壤, 其中的可溶性碳源与氮源易通过灌溉水输入到深层土壤, 导致环境条件发生改变, 相应会影响土壤剖面深层微生物群落的结构及其生理生态功能。然而, 目前已有的大量研究集中于耕作层 (0 - 20 cm) 土壤, 对于深层土壤, 特别是 100 cm

基金项目: 国家自然科学基金 (41301102); 中国科学院“西部之光”人才培养计划“西部博士资助项目” (XBBS201001); 国家国际科技合作计划项目 (2011DFA31070)

* 通信作者。Tel: +86-991-7885417; E-mail: tangls@ms.xjb.ac.cn

作者简介: 李晨华 (1974 -), 女, 江苏宜兴人, 博士, 主要从事土壤生态与微生物生态研究。E-mail: lichenhua@ms.xjb.ac.cn

收稿日期: 2013-05-20; 修回日期: 2013-09-17

以下的土壤微生物群落结构的研究鲜有报道,农田管理措施对土壤表层及不同剖面深度的微生物群落结构的影响、及微生物群落与土壤性质间的关系,仍缺乏相应的研究。

长久以来,技术手段是限制土壤微生物原位研究的重要因素。传统的微生物培养方法无法真实反映自然土壤微生物的物种多样性。BIOLÓG 可研究土壤微生物群落对碳源利用能力的变化规律,但无法对土壤微生物进行分类研究。20 世纪 70 年代以来,以 rRNA 系统发育关系为基础的三域分类基础逐渐得到了广泛认可,极大地改变了对土壤微生物多样性的认识。例如,变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 能够研究土壤微生物群落多样性变化规律,但其所获得的微生物 DNA 序列通常低于 100 条,难以对土壤微生物进行全面分析。2008 年以来,新一代测序技术通量与成本分别呈指数式的增加与下降趋势,正在取代常规的分子指纹图谱技术,为研究微生物多样性在维系土壤生态系统功能方面的作用提供了重要技术支撑。需要指出的是,该技术仅能提供具体的微生物分类信息,无法研究土壤微生物的功能,如何发挥不同技术的优势,特别是不同技术研究结果之间的标准化比较体系构建,是未来耦合研究土壤微生物多样性与功能的重要内容。

灰漠土是我国西北干旱地区重要的农业土壤,主要分布于新疆天山北麓和甘肃河西走廊并发育于黄土状母质,过去 50 多年来新疆新绿洲的开发大多以灰漠土为基础,是新疆重要的粮、棉、油生产基地和后备耕地资源。然而,农业管理措施如大量施肥与灌溉导致土壤理化属性的改变,极可能对微生物群落特别是数量上不占优势的微生物功能群产生较大的影响。但人为活动特别是农业管理措施对灰漠土微生物多样性的影响仍不清楚。为了全面认识长期不同施肥模式下灰漠土土壤微生物群落的变化特征,本研究采用高通量测序技术,以中国科学院阜康荒漠生态系统国家研究站的长期定位试验为平台,选择长期单施化肥 (CF) 与化肥配施秸秆 (CF/OM) 两种施肥方式,以无肥处理 (CK) 作为对照,研究 0 - 300 cm 剖面不同深度的微生物群落;同时结合土壤理化性质 (如 pH、电导、SOC 及全 N) 分析,以阐明土壤微生物群落的剖面变化特征、初步探求灰漠土微生物群落多样性的驱动机制。

1 材料和方法

1.1 研究区概况与实验设计

长期定位试验在中国科学院新疆阜康荒漠生态系统国家野外科学观测研究站 (44°17'N, 87°56'E, 海拔 461m) 进行。阜康站位于准噶尔盆地南缘,年降水量小于 200 mm,蒸发潜力高于 1000 mm,属于典型干旱区气候。土壤类型为灰漠土,土壤发生系统分类名称为 Calciorthid,土壤质地为粉砂壤土,土壤表层 (0 - 20 cm) 中,粘粒、粉粒、砂粒含量分别为 7.6%、69.7% 与 22.7%;总盐含量为 21 - 90 g/kg; pH 值为 8.4 - 9.0; 土壤有机质含量 0.6% - 1.7%^[5]。

灰漠土农田土壤养分长期定位实验始建于 1990 年。采用冬小麦种植,每年 9 月份播种,第二年 6 月底至 7 月初收获,其中包括 3 种施肥处理 (不施肥 CK, 单施化肥 CF, 化肥配施秸秆 CF/OM), 每个处理各 3 个重复 (共 9 个小区), 每个试验小区面积 33 m²。单施化肥 CF 处理的化肥用量为年施尿素 N 300 kg/hm²、P₂O₅ 150 kg/hm²、K₂O 60 kg/hm²。化肥配施秸秆 CF/OM 处理是在施同量的氮肥与磷肥的基础上,将上年该处理小区秸秆总量的 70% 还田施入,由于冬小麦秸秆中钾含量较高,故该处理中无钾肥施入^[6]。氮肥每年分两次施入,分别作为基肥与追肥,各为 50%,磷肥、钾肥均作为基肥一次性施入。氮、磷、钾肥分别选用尿素、过磷酸钙和硫酸钾。小麦秸秆连带麦粒一起人工收割,留下约 5 cm 麦茬。脱除麦粒的新鲜秸秆 (总 C、N、P 与 K 含量分别为 390、4.9、0.7 和 14.3 g/kg), 1 - 2 d 内粉碎耕埋后直接还田。每年平均灌溉量为 6 000 m³ / (hm·yr)。分 5 - 6 次灌溉,第一次在播种 (9 月份) 前 7 天进行,第 2、3 次分别在 10 月与来年的 4 月进行,在来年 4 月到 6 月下旬小麦收割之间,根据具体情况来进行灌溉 2 - 3 次。

1.2 样品采集与土壤性质测定

土壤样品采集在 2010 年 6 月底 (冬小麦收割后) 进行,取样深度为 0 - 300 cm。具体采样方式如下:对 CK、CF 和 CF/OM 处理的每个小区随机选取 5 个取样点,用螺旋取土钻采集 0 - 20、20 - 40、40 - 60、60 - 100、100 - 150、150 - 200、200 - 250、250 - 300 cm 剖面深度的土样。每个小区同一土层的土

壤样品组成混合代表样, 所取土样去除杂物、细根, 碾碎后混匀。部分土样保存于 -80°C 以备土壤 DNA 提取及其后续测定; 其余土样风干后过筛测定土壤理化性质。SOC 与全氮 (TN) 用总有机碳/总氮分析仪 (Multi C / N 3100) 测定, 土壤 pH 与电导 (EC) 分别采用电位法与电导法 (土水比为 1:5) 测定。

1.3 土壤总 DNA 提取与焦磷酸测序分析

称取相当于 0.5 g 干土重量的新鲜土壤样品, 采用 FastDNA © SPIN Kit For Soil (MP Biomedicals, LLC) 试剂盒提取土壤微生物总 DNA, 利用 Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) 分析土壤 DNA 的质量, 并通过 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。将土壤 DNA 样品纯化后并稀释至 $100\text{ ng}/\mu\text{L}$, 利用细菌与古菌 16S rRNA 基因的通用引物 515F (GTGCCAGCMGCCGCGG) 与 907R (CCGTCAATTCMTTTRAGT TT) 扩增其 V3-V4 区基因片段。修饰后的通用引物含有不同的 Tag 标签用以区分不同样品。PCR 反应体系 (Qiagen, Valencia, CA, USA) 为 $50\ \mu\text{L}$, 其中含 TaKaRa Ex Taq HS ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$) $0.25\ \mu\text{L}$ 、 $10 \times$ Ex Taq Buffer (Mg $^{2+}$ + Plus) $5\ \mu\text{L}$ 、dNTP Mixture (各 $2.5\ \text{mmol/L}$) $4\ \mu\text{L}$ 、PCR Forward Primer ($10\ \mu\text{mol/L}$) $1\ \mu\text{L}$ 、PCR Reverse Primer ($10\ \mu\text{mol/L}$) $1\ \mu\text{L}$ 、以及 DNA 模板 $1\ \mu\text{L}$, 加无菌水补足 $50\ \mu\text{L}$ 。PCR 扩增的反应条件为: 94°C , $5.0\ \text{min}$; $30 \times (94^{\circ}\text{C}, 45\ \text{s}; 55^{\circ}\text{C}, 45\ \text{min}; 72^{\circ}\text{C}, 1\ \text{min})$; 72°C , $10\ \text{min}$ 。每个样品 3 个重复。利用凝胶回收方法与 PicoGreen (Invitrogen, Shanghai, China) 对 PCR 扩增产物进行纯化与定量。不同样品的 PCR 产物以等摩尔比的形式合并到一个试管中, 以备焦磷酸测序分析。

根据 Roche 454 公司的操作指南, 将 A 和 B 接头连接至 16S rRNA 基因 PCR 扩增子的特定末端进行高通量焦磷酸测序 (454 Life Sciences Genome Sequencer FLX Titanium sequencer)。利用 RDP pyrosequencing pipeline (<http://pyro.cme.msu.edu/>) 对 16S rRNA 基因序列进行读取与分析。共计获得约 10 万序列, 在 80% 的置信度水平采用 RDP Classifier 进行分类^[7], 只有大于 200 bp 长度、质量评分平均高于 25、且无歧义碱基读出的序列才能进行后续分析^[8]。利用一个自定义代码通过完

全连锁聚类运算, 读段聚集成最小分类单元 (OTU)。得到高质量序列约 7.2 万条, 单个样品的高质量序列平均 1000 条, 单个序列平均长度为 455 bp。高通量序列具体分析流程参考已有的方法^[9]。

1.4 数据分析

利用 Spass 11.5 对不同土层与处理的微生物类群 (从 Phylum 到 Order) 与土壤性质等相关数据进行统计分析, 利用 t-test 检测显著性差异 (LSD)。典范对应分析 (Canonical correspondence analysis (CCA)) 用来揭示微生物分类群与土壤性质的关系。鉴于表层 (0–20 cm) 土壤直接受到施肥灌溉等农业管理的影响, 与深层 (20–300 cm) 土壤环境差别极大, 我们将表层与深层土壤微生物分类群与相应土壤性质 (土壤 pH、电导、有机 C 及全 N) 分别进行了 CCA 分析。CCA 分析结果以 Ordination plots 形式呈现 (Canoco 4.5), 同时, 利用软件中的 forward 选项寻找影响最为显著的环境变量。

2 结果

2.1 土壤性质

0–300 cm 的土壤剖面中, 表层 (0–20 cm) SOC 和总氮含量最高, 并且随着土壤深度的增加而显著减少。相反, 土壤 pH 及 EC 则呈相反趋势, 随着土壤深度的增加而显著升高 (图 1)。与不施肥对照处理 CK 相比, 两种施肥处理显著地增加了表层土壤 SOC 与 TN 的含量, 并降低了 pH 与 EC 值。各处理间土壤性质的差异, 随土壤深度的增加而减小。单施化肥 CF 处理虽然提高了 0–60 cm 深度的 SOC 含量, 但降低了 60 cm 以下剖面的 SOC 含量, 化肥配施秸秆 CF/OM 处理导致 20 cm 以下土层 SOC 含量略有增加, 但两种施肥方式均增加了深层 (20–300 cm) 土壤的 TN 含量, 并降低了 pH 值。此外, 单施化肥 CF 增加了深层土壤电导值 EC, 但化肥配施秸秆则导致深层土壤电导值则有所降低。

2.2 土壤微生物群落

3 种处理中, 微生物优势类群在土壤剖面变化特征相似, 这里以 CK 处理为例 (图 2)。Actinobacteria 与 Proteobacteria 是灰漠土表层土壤 (0–20 cm) 中的优势类群, 占有微生物的相对比例分别为: 24.6%–32.7% 与 19.7%–32.7%, 其

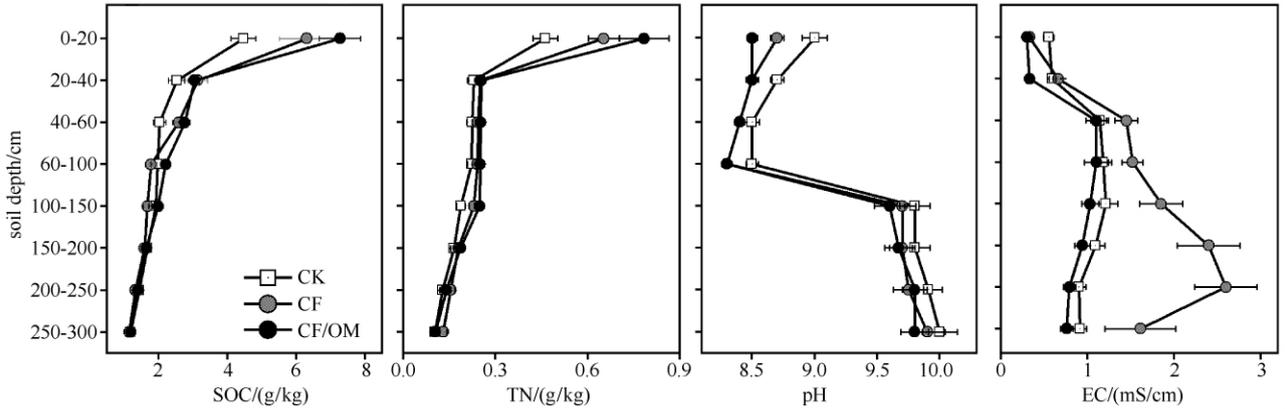


图 1. 长期施肥对不同土层 (0-300 cm) 土壤有机碳 (SOC) 与全氮 (TN) 含量、pH 值与电导 (EC) 的影响 (CK: 不施肥, 单施化肥 CF, 化肥配施秸秆 CF/OM)

Figure 1. Effect of different fertilizer treatments on soil organic carbon (SOC), total N (TN), pH and electrical conductivity (EC) at different depths (0-300 cm). CK: no fertilizer; CF: inorganic fertilizer alone; CF/OM: inorganic fertilizer combined with straw.

中, α -proteobacteria (Alphaproteobacteria) 相对丰度最高 (9.1% - 10.5%)。随土壤深度的增加, Actinobacteria 相对丰度减少, 而 Proteobacteria 相对丰度增加, 逐渐成为深层 (20-300cm) 土壤的优势类群, 其中, γ -proteobacteria 与 β -proteobacteria (Gammaproteobacteria 及 Betaproteobacteria) 增加最为显著, 是深层土壤 Proteobacteria 中最丰富类群, 特别是前者。此外, 与表层土壤相比, Firmicutes 与 Acidobacteria 在特定土壤剖面深度 (40-150 cm 和 150-300 m) 中的相对丰度显著增加, 并成为仅次于 Proteobacteria 的优势类群。

长期施肥显著改变了表层土壤微生物群落组成。图 3 显示, 施肥管理 (CF 与 CF/OM) 显著增加了 γ -proteobacteria 与 β -proteobacteria 的相对丰度, 其中, γ -proteobacteria 中以 Methylococcales 增加最为显著, CF 与 CF/OM 处理的增加倍数分别为 44 与 101, Pseudomonadales 的增加倍数分别为 1.6 与 4.8 (表 1)。对于 β -proteobacteria, CF/OM 处理中 Burkholderiales 增加了 3.6 倍, 而 CF 处理则降低了 74.1 倍 (表 1)。不施肥 CK 处理中未能检测到 Nitrosomonadales, 而单施化肥 CF 处理中其相对丰度高达 2.2% (表 2); 此外, 此外, 施肥显著降低了 δ -

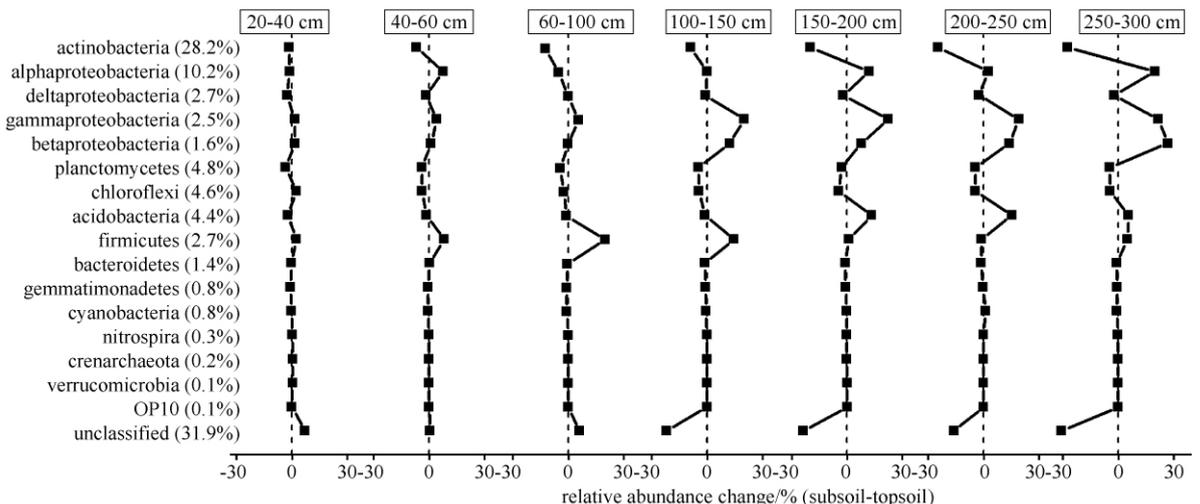


图 2. 无肥处理 (CK) 深层 (20-300 cm) 土壤中微生物相对丰度的变化量 (与表层相比) (注: 左栏所列 CK 处理中表层 (0-20 cm) 土壤微生物群落及其相对丰度)

Figure 2. Change in relative abundance of microbial phylotypes at 20-300 m depths comparing with the topsoil in no fertilizer treatment (CK). Soil microbe and its relative abundance in the topsoil (0-20 m) of CK treatment were listed in the left column.

proteobacteria (Deltaproteobacteria) 与 α -proteobacteria 的相对丰度; 而 Actinobacteria 其相对丰度在 CF 处理中降低、在 CF/OM 处理中则略微增加。同时, 非优势类群的相对丰度也发生了改变, 主

要表现在: 施肥降低了 Bacteroidete 与 Chloroflexi 的相对丰度, 且增加了 Crenarchaeota、Firmicutes、Acidobacteria、Gemmatimonadetes (图 3) 与 Nitrospira (表 2) 的相对丰度。

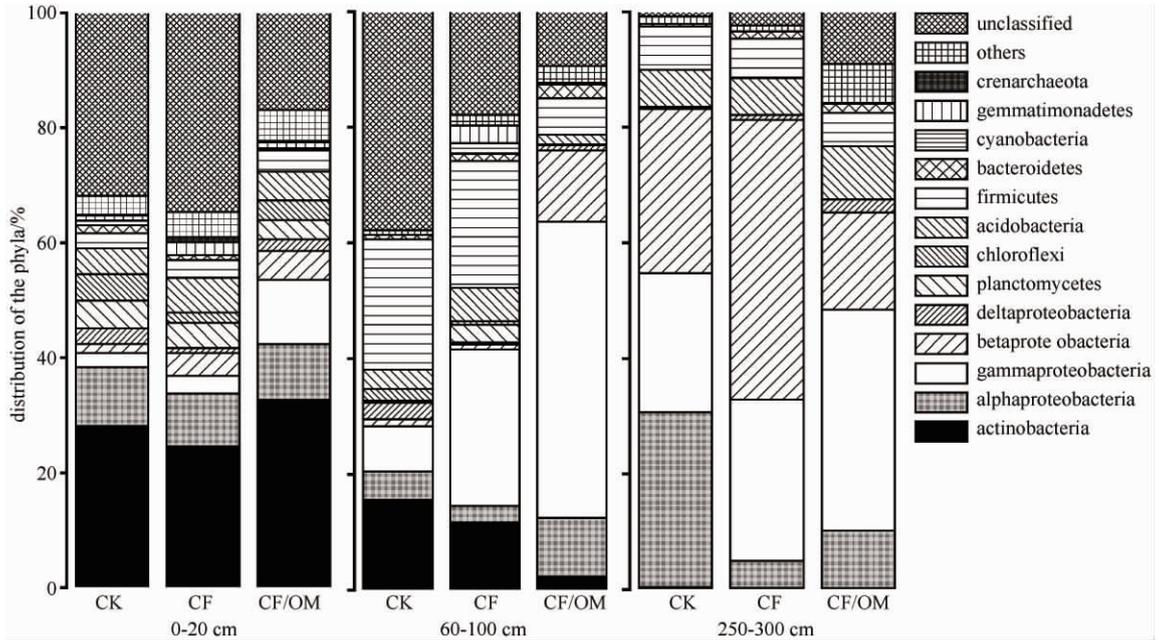


图 3. 长期施肥对不同土层土壤微生物群落相对丰度的影响 (60-100 cm 与 20-40 cm、40-60 cm 土层变化规律相近, 250-300 cm 与 100-150 cm、150-200 cm、200-250 cm 土层变化规律相近, 这里各选用一个土层代表)

Figure 3. Relative abundance of microbial phylotypes at different depths under long-term fertilizers. the trend of soil bacterial community at 60-100 cm depth was similar to that at 20-40 cm and 40-60 cm depths, and the trend at 250-300 cm depth was similar to that at 100-150 cm, 150-200 cm and 200-250 cm depths. The 60-100 cm and 250-300 layers were selected as the representatives.

长期施肥使得深层 (20-300 cm) 土壤微生物群落也发生了改变 (图 3)。例如, CF 处理增加了深层 γ -proteobacteria 中 Xanthomonadales 的相对丰度 (增加了 1.2-69.7 倍); CF/OM 处理增加了 60-300 cm 土层 γ -proteobacteria 中 Enterobacteriales 的相对丰度 (增加了 2.1-25.5 倍) (表 1); 施肥 (CF 与 CF/OM) 增加了 40-200 cm 土层的 γ -proteobacteria 中 Pseudomonadales 与 20-100 cm 土层 β -proteobacteria 中 Rhodocyclales 的相对丰度, 但降低了 200-300 cm 土层与 100-200 cm 土层相应类群的相对丰度; 施肥降低了 20-150 cm 土层同时增加了 150-300 cm 土层的 δ -proteobacteria 的相对丰度; 施肥降低了 40-300 cm 土层 Actinobacteria 的相对丰度, 同时增加了 20-200 cm 土层中 Nitrospira (表 2) 与 20-150 cm 土层中芽单孢菌门的相对丰度。此外, 施肥虽然降低了近表层

Bacteroidetes 的相对丰度, 但增加了该类群在 60-300 m 土层的相对丰度, CF/OM 处理增幅较高。

2.3 土壤性质与微生物群落的相关性分析

CANOCO 的 forward 分析表明, 在土壤 SOC、TN、pH 和 EC 中, TN 对表层 (0-20 cm) 土壤微生物群落结构具有最大影响, 影响顺序为: TN > SOC > EC > pH; 而 SOC 与 EC 对深层 (20-300 cm) 土壤微生物群落结构具有显著影响 (P 值为 0.022 和 0.041), 尤其是 SOC, 影响顺序为: SOC > EC > TN > pH。

进一步的 CCA 分析表明不同施肥模式的土壤微生物群落发生明显的分异 (图 4)。表层土壤中, 施肥处理的 SOC 和 TN 较高并且其微生物群落发生聚类, 同时低 pH 和 EC 的土壤微生物群落也聚类在邻近区域, 而 CK 处理土壤微生物群落则主要聚类于高 pH 与 EC 的区域中。说明两种施肥模式 CF 与

CF/OM 处理的土壤微生物群落结构较为接近,但与 CK 明显不同。深层土壤微生物群落的 CCA 分析结果与表层存在明显差异。3 种处理在深层土壤中分别处于不同区域:CF/OM 处理位于高 SOC 与 TN 区

域;CF 处理位于高 EC 区域;而 CK 处理则位于高 pH 值区域。表明 CK、CF 与 CF/OM 三个处理在深层的微生物群落结构较为分散。

表 1. 长期施肥模式 (CF and CF/OM) 下不同土层 (0–20 cm、60–100 cm 与 250–300 cm) 土壤微生物群落相对丰度的变化倍数 (与无肥处理 CK 相比)

Table 1. Fold changes in OUT abundances in long-term fertilizers treatments (CF and CF/OM) comparing with no fertilizer treatment (CK)

taxonomic rank	name	CF		CF/OM		CF		CF/OM		CF		CF/OM	
		(0–20 cm)		(0–20 cm)		(60–100 cm)		(60–100 cm)		(250–300 cm)		(250–300 cm)	
		increase	decrease	increase	decrease	increase	decrease	increase	decrease	increase	decrease	increase	decrease
phylum	actinobacteria		1.1	1.2			1.3	6.6		1.1			1.4
phylum	proteobacteria	1.0		1.7		1.9		4.4		1.0			1.2
class	alphaproteobacteria		1.1		1.0		1.7	2.1		6.6			3.0
class	deltaproteobacteria		3.1		1.3		7.0		3.4	2.5		6.4	
class	gammaproteobacteria	1.2		4.4		3.5		6.6		1.2		16.0	
order	methylococcales	43.9		101.1		1.0		28.6					
order	xanthomonadales	1.2			1.1	69.7		106.2		12.8		10.3	
order	pseudomonadales	1.6		4.8		5.3		11.4			1.4		1.3
order	enterobacteriales						8.2	3.1		11.0		25.2	
class	betaproteobacteria	2.5		3.2			1.5	10.2			1.7		1.7
order	burkholderiales		74.1	3.6		2.1		13.5		1.9			1.6
order	rhodocyclales					1.0		29.7					
phylum	chloroflexi		2.6		1.4		3.3		14.4				
phylum	acidobacteria	1.4		1.1		1.8			2.0	1.0		4.7	
phylum	firmicutes	1.1		1.4			1.0		3.5		1.1		1.3
class	bacilli	1.2		2.0			1.1		4.1		1.1		2.8
phylum	bacteroidetes		1.6		4.1	1.5		2.8		2.9		3.5	
class	sphingobacteria	1.0			4.1		2.0	2.0			27.1	5.9	
class	flavobacteria					82.0		41.9		14.6			8.9
phylum	gemmatimonadetes	2.6		1.2		30.7		2.8					
phylum	nitrospira	1.5		2.4		2.0		2.7					
phylum	crenarchaeota	4.7		1.8									

表 2. 长期施肥对土壤剖面 (0–300 cm) 氨氧化细菌相对丰度的影响

Table 2. Long-term effects of fertilizer application on relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria community throughout the soil profile (0–300 cm) (NO: Nitrosomonadales; NP; Nitrospira)

soil depth/cm	CK		CF		CF/OM	
	NO/%	NP/%	NO/%	NP/%	NO/%	NP/%
0–20	0.00	0.28	2.16	0.44	0.00	0.67
20–40	0.00	0.49	0.01	0.54	0.00	0.59
40–60	0.00	0.12	0.00	0.13	0.00	0.25
60–100	0.00	0.08	0.41	0.16	0.00	0.22
100–150	0.00	0.00	0.00	0.12	0.00	2.91
150–200	0.00	0.03	0.29	0.43	0.00	0.50
200–250	0.00	0.00	0.18	0.00	0.00	0.00
250–300	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Total	0.00	1.00	3.05	1.82	0.00	5.14

表层土壤中, Nitrospira、Firmicutes 及 γ -proteobacteria 中 Methylococcaceae 与 Pseudomonadales

的相对丰度与较高 SOC、TN 含量及较低 pH、EC 值相关; 而 δ -proteobacteria、Cyanobacteria、Chloroflexi 与 γ -proteobacteria 中 Legionellales 的相对丰度与较高 pH、EC 值及较低碳、氮含量相关。深层土壤中, γ -proteobacteria 中 Methylococcaceae、Pseudomonadales 及 Enterobacteriales、Bacteroidetes 中 Sphingobacteria

与较高 SOC、TN 及较低 EC、pH 值相关; Gemmatimonadetes、Cyanobacteria、Crenarchaeota、Chloroflexi、 γ -proteobacteria 中 Vibrionales 及 Xanthomonadales 与较高土壤 EC 值显著相关; Actinobacteria、 δ -proteobacteria、 β -proteobacteria 中 Rhodocyclales 与较高 pH 值相关。

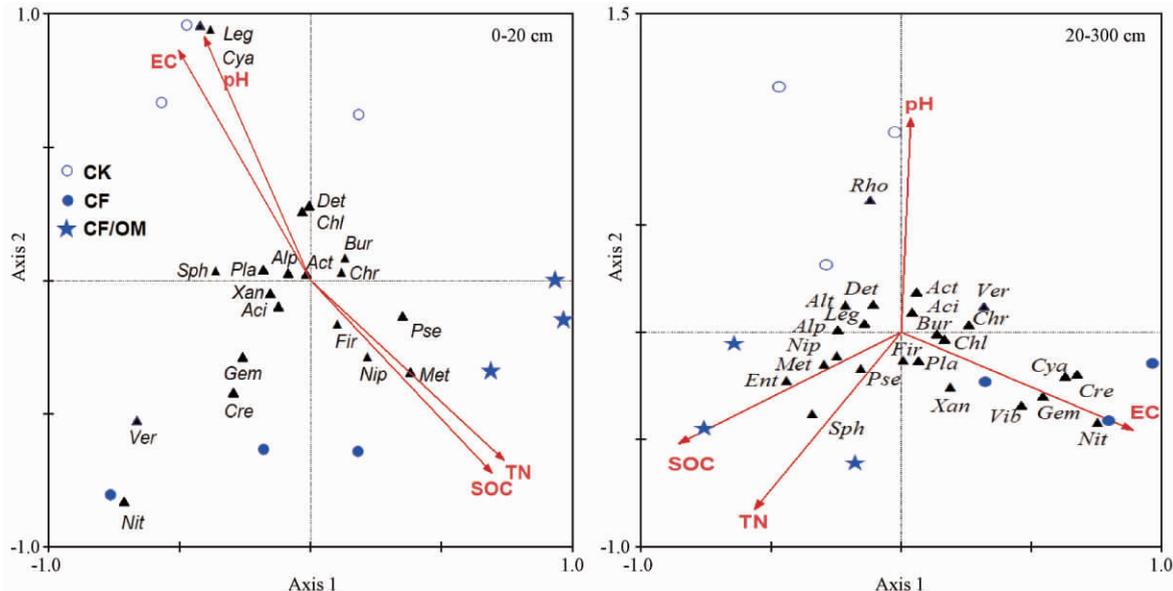


图 4. 不同施肥模式 (CK, CF 与 CF/OM) 下表层 (0-20 m) 与深层 (20-300 cm) 土壤性质 (SOC、全氮 (TN)、pH 与电导 (EC)) 与微生物群落的 CCA 分析

Figure 4. The results from canonical correspondence analysis (CCA) to explore the relationship between microbial populations and selected soil properties such as SOC, total N (TN), soil pH and electric conductance (EC) at 0-20 cm and 20-300 cm depths under different fertilizers (CK, CF and CF/OM). Actinobacteria = Act, Alphaproteobacteria = Alp, Deltaproteobacteria = Det, Methylococcales (order) = Met, Xanthomonadales (order) = Xan, Pseudomonadales (order) = Pse, Enterobacteriales (order) = Ent, Chromatiales (order) = Chr, Legionellales (order) = Leg, Vibrionales (order) = Vib, Burkholderiales (order) = Bur, Nitrosomonadales (order) = Nit, Rhodocyclales (order) = Rho, Sphingobacteria (order) = Sph, Acidobacteria = Aci, Firmicutes = Fir, Chloroflexi = Chl, Gemmatimonadetes = Gem, Nitrospira = Nip, Verrucomicrobia = Ver, Planctomycetes = Pla, Cyanobacteria = Cya, Crenarchaeota = Cre.

3 讨论

3.1 土壤微生物群落的剖面分布特征

已有报道大多利用土壤生物化学手段分析土壤剖面微生物量的变化规律, 如底物诱导呼吸策略 (SIR) 和土壤微生物磷脂脂肪酸 (PLFA)^[10] 等技术, 仅有的高通量 454 测序技术报道来自于科罗拉多草地土壤剖面微生物多样性研究^[11]。相关研究表明^[11-13], Proteobacteria 相对丰度会随土壤深度降低, Actinobacteria 相对丰度则在深土层中较高。我们的研究结果与之具有明显差异。本研究中, Actinobacteria 与 Proteobacteria 在表层土壤中相对丰

度最高, 并且 Actinobacteria 随深度增加而减少, 而 Proteobacteria 的相对丰度则随深度而增加 (图 3), 逐渐成为深层土壤的绝对优势类群。土壤母质与土地利用方式的不同可能是产生上述差异的原因。通常情况下放线菌适应好氧环境, 而周期性灌溉与研究区较高的地下水位, 使得土壤含水量随土壤深度的增加而升高, 氧气含量随之下降低, 这可能是 Actinobacteria 随深度其相对丰度降低的一个原因。相反, 研究区表层土壤 pH 值在 8 以上, 1 m 以下土层可达到 9.7-10.1 (图 1), 可能选择性刺激了偏好较高 pH 的 Proteobacteria 微生物生长, 使其成为深层土壤剖面的优势微生物类群。

与表层土壤相比, Firmicutes 在 40-150 cm 土

层中显著增加,可能与表层盐通过灌溉水下移、致使该土层盐含量较高有关(图1)。研究区中 Firmicutes 的绝对优势类群为芽孢杆菌纲(Bacilli),其在抗盐碱方面具有优势。另外, Acidobacteria 可被划分为贫营养细菌,倾向于 k-策略。研究区 Acidobacteria 相对丰度在 150 - 300 cm 土层显著高于表层(图2),与该土层中较低 SOC/全 N 含量(图1)相吻合。已有的研究^[14]认为 Acidobacteria 大部分属于嗜酸菌,但我们的数据显示,在 pH 为 9.7 - 9.9 的环境中,其相对丰度最高可达 27.1%,还需要进一步研究。

3.2 施肥对土壤微生物群落的影响

表层土壤中,长期施肥增加了 γ -proteobacteria 与 β -proteobacteria 的相对丰度,降低了 α -proteobacteria 与 Bacteroidetes 的相对丰度(图3),这与相关报道一致^[15-16]。放线菌参与木质素与几丁质等有机质的分解,CF/OM 处理中可能由于秸秆的施入,增加了其表层土壤 Actinobacteria 的相对丰度。此外,施肥引起的表层土壤 pH 下降,可能导致了施肥处理中 Acidobacteria 相对丰度的增加。深层土壤微生物群落对施肥也有明显响应,但此种响应与表层土壤相比存在差异。施肥与灌溉等管理措施、以及深层土壤自身的物理化学因素均可能对微生物群落产生影响,比如土壤养分可利用量、土壤粒径组成及 pH 值等在土壤剖面的变化、肥料中可溶性碳源与氮源随灌溉水向深层的输入、O₂ 状况等,导致不同土壤深度的微生物群落类群在组成与相对丰度方面均有显著差异。而且,部分微生物类群随土壤深度不具有连续或一致的变化趋势。例如,与不施肥 CK 处理相比,施肥处理近表层土壤中 Bacteroidetes 的相对丰度降低,但在 60 - 300 cm 土层中则显著增加,而且它们的主要类群 Sphingobacteria 与 Flavobacteria,在施肥处理间不同土层中的变化趋势也不完全相同(表1)。此外,研究区土壤剖面的 Acidobacteria 包含了 16 个类群(数据未呈现),各类群组成与丰度在处理间与土层间均有差异,导致各施肥处理的 Acidobacteria 在土壤剖面中没有连续的变化规律。这种不一致性在先前的一些研究中也有所体现^[11-12]。

不同施肥方式通过带入土壤中的不同物料,导致土壤微生物群落结构的改变,使得能够适应环境变化的微生物群落得以生长繁殖^[12]。本研究中,CF

处理增加了整个剖面 γ -proteobacteria 中 Xanthomonadales 的相对丰度,同时还导致了其它一些微生物类群较高的相对丰度,如 Gemmatimonadetes、Verrucomicrobia、Crenarchaeota 及 β -proteobacteria 中的 Nitrosomonadales; 化肥秸秆配施 CF/OM 处理增加了 60 - 300 cm 土层 γ -proteobacteria 中 Enterobacteriales 的相对丰度,也与 Nitrospira、Bacteroidetes 中的 Sphingobacteria 及 γ -proteobacteria 中其它细菌类群(如 Methylococcales、Pseudomonadales)较高的相对丰度有关(图4)。

研究区灰漠土中 Nitrospira 的相对丰度很低,施肥处理(CF 与 CF/OM)显著增加了 0 - 200 cm 土层中 Nitrospira 的相对丰度,且在化肥配施秸秆 CF/OM 处理的大多土层中增幅高于 CF 处理(表2)。此外,单施化肥处理土壤中检测到 Nitrosomonadales,并在土壤剖面多个深度中均有发现。这表明,Nitrosomonadales 与 Nitrospira 是 CF 处理中氨氧化细菌和硝化细菌的两个主要群落组成,前者是硝化过程的限速步骤。同时,我们前期利用荧光定量 PCR 技术所获得的结果表明^[17]:氨氧化古菌(AOA)是研究区泉古菌(Crenarchaeota)的主要组成,且 CF 处理中 AOA 的丰度高于 CF/OM,这与本研究利用焦磷酸测序获得的结果一致(施肥增加了表层 Crenarchaeota 的相对丰度,CF 处理的增幅高于 CF/OM 处理,表1)。总之,20 年的施肥处理显著增加了表层甚至是深层土壤氨氧化微生物的相对丰度;施肥处理不同,氨氧化微生物群落结构与组成也有明显差异。我们推测土壤剖面氨氧化细菌分布规律的驱动机制如下:其一,大量施入的尿素 N,随灌溉水下移至深土层并作为底物,刺激氨氧化细菌的生长;其二,如我们已有的报道^[17],施用尿素氮肥刺激了表层土壤中氨氧化细菌的生长,细菌细胞可能随灌溉水运移至深土层。然而,由于各个因素之间极可能相互作用并且极为复杂,例如,不同施肥处理(CF 与 CF/OM)中,进入土壤的 N 素在质与量方面的不同(前者仅为尿素 N,而后者是尿素与秸秆 N 素的结合),也可能导致氨氧化细菌在土壤剖面的分布规律产生明显差异,其生态功能与多样性维持机制仍需进一步研究。

3.3 土壤微生物群落与土壤性质及施肥方式的关系

在微生物分类学门的水平上,已有研究表明

pH、有机质组成、土壤类型与植被强烈影响土壤微生物主要类群^[18-19]。同时,微生物生理生态过程可能改变土壤中营养元素的生物地球化学过程,如微生物驱动的营养分解、转化与存贮,进一步影响土壤物理化学属性,进而影响土壤微生物多样性,并对土壤生态系统的结构、功能及过程产生一定的影响。本研究中,土壤表层与深层土壤环境的不同,使得微生物群落与土壤性质及施肥方式间的关系也存在差异(图4)。整个土壤剖面中,SOC/全N含量与较高丰度的 γ -proteobacteria中的微生物类群(如Methylococcales与Pseudomonadales)及Nitrospira具有相关性,此外,表层土壤中SOC/全N含量还与较高丰度的厚壁菌门相关;深层土壤中碳源和氮源含量还与较高丰度的 γ -proteobacteria中Enterobacteriales与Bacteroidetes中的Sphingobacteria相关。同时,表层土壤中两种施肥方式(CF与CF/OM)均与较高SOC/养分含量相关,但深层施肥处理间出现明显分异:只有化肥配施秸秆处理(CF/OM)与较高碳、氮含量显著相关。大量研究表明C与N的生物有效性对微生物群落多样性更为重要^[20-21]。通过CANOCO的forward分析,我们的研究结果也表明:TN和SOC含量分别是表层与深层土壤微生物群落结构最重要的影响因子。单施化肥处理与化肥配施秸秆处理,通过20年的长期施肥,均提高了表层SOC/全N含量,两者土壤微生物群落结构相似(图4);但在深层,只有化肥配施秸秆处理提高了SOC含量,而单施化肥处理显著降低了SOC含量,3种处理(CK、CF与CF/OM)中的微生物群落结构也各不相同。然而,土壤微生物多样性变化对生态功能的影响,特别是土壤微生物群落演替对农田生态系统结构与功能稳定性的影响仍然不清楚,研究有待于进一步开展。

4 结论

Proteobacteria是研究区整个土壤剖面(0-300 cm)的优势微生物类群。其中,表层(0-20 cm)以 α -proteobacteria最为丰富,随着土壤深度的增加, γ -proteobacteria与 β -proteobacteria显著增加,逐渐成为深层(20-300 cm)土壤中最丰富类群。与无肥处理CK相比,施肥处理CF与CF/OM的微生物群落在土壤剖面中有明显分离。例如,CF处理增加了

整个剖面 γ -proteobacteria中Xanthomonadales的相对丰度,CF/OM处理增加了60-300 m土层 γ -proteobacteria中Enterobacteriales的相对丰度。在整个土壤剖面中,Nitrospira、 γ -proteobacteria中的Methylococcales及Pseudomonadales与较高碳、氮含量相关。此外, γ -proteobacteria中的Enterobacteriales、Bacteroidetes中的Sphingobacteria还与深层土壤中较高碳、氮含量相关。全N和SOC含量分别是表层与深层土壤微生物群落结构的最大影响因子。20年的单施化肥与化肥配施秸秆处理,提高了表层土壤碳、氮含量,相应改变了土壤微生物群落,而化肥配施秸秆处理所选择出的土壤微生物群落则与其深层中SOC的增加相关。

参考文献

- [1] Seneviratne G. Collapse of beneficial microbial communities and deterioration of soil health: a cause for reduced crop productivity. *Current Science*, 2009, 96 (5): 633.
- [2] Sandhu HS, Gupta Vadakattu VSR, Wratten Stephen D. Evaluating the economic and social impact of soil microbes. // Dixon G R, Tilston E L (eds.) *Soil microbiology and sustainable crop production*. Springer Science Business Media BV. 2010, pp 399-417.
- [3] Papatheodorou EM, Efthimiadou E, Stamou GP. Functional diversity of soil bacteria as affected by management practices and phenological stage of *Phaseolus vulgaris*. *European Journal of Soil Biology*, 2008, 44 (4): 429-436.
- [4] Birkhofer K, Bezemer TM, Bloem J, Bonkowski M, Christensen S, Dubois D, Ekelund F. Long-term organic farming fosters below and aboveground biota: Implications for soil quality, biological control and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40: 2297-2308.
- [5] Li CH, Li Y, Tang LS. The effects of long-term fertilization on the accumulation of organic carbon in the deep soil profile of an oasis farmland. *Plant and Soil*, 2013, 369 (1-2): 645-656.
- [6] Wang ZQ, Li SG, Chen XJ. *Nutrient circulation in the farmland ecosystems in the desert Oasis*. Beijing: Science Press, 2002, 52-56.
- [7] Claesson M, O'Sullivan O, Wang Q, Nikkila J, Marchesi JR, Smidt H, Devos WM, Ross RP, O'Toole PW. Comparative Analysis of Pyrosequencing and a

- Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine. *PLoS One*, 2009, 4 (8) : e6669.
- [8] Huse S, Huber J, Morrison H, Sogin M, Welch D. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology*, 2007, 8 (7) : R143.
- [9] Zheng Y and Jia ZJ. Next generation sequencing and stable isotope probing of active microorganisms responsible for aerobic methane oxidation in red paddy soils. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (2) : 173-184. (in Chinese)
郑燕, 贾仲君. 新一代高通量测序与稳定性同位素示踪 DNA/RNA 技术研究稻田红壤甲烷氧化的微生物过程. *微生物学报*, 2013, 53 (2) : 173-184.
- [10] Holden PA, Fierer N. Microbial Processes in the Vadose Zone. *Vadose Zone Journal*, 2005, 4: 1-21.
- [11] Eilers KG, Debenport S, Anderson S, Fierer N. Digging deeper to find unique microbial communities: The strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 50: 58-65.
- [12] Hansel CM, Fendorf S, Jardine, PM, Francis CA. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74: 1620-1633.
- [13] Will C, Thurmer A, Wollherr A, Nacke H, Herold N, Schrupf M, Gutknecht J, Wubet T, Buscot F, Daniel R, Horizon-specific bacterial community composition of german grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76: 6751-6759.
- [14] Campbell BJ, Polson SW, Hanson TE, Mack MC, Schuur EA. The effect of nutrient deposition on bacterial communities in Arctic tundra soil. *Environmental Microbiology*, 2010, 12 (7) : 1842-1854.
- [15] Ramirez KS, Lauber CL, Knight R, Bradford MA, Fierer N. Consistent effects of N fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. *Ecology*, 2010, 91: 3463-3470.
- [16] Wang BZ, Zhang CX, Liu JL, Zeng XW, Li FR, Wu YC, Lin XG, Xiong ZQ, Xu J, Jia ZJ. Microbial community changes along a land-use gradient of desert soil origin. *Pedosphere*, 2012, 22 (5) : 593-603.
- [17] Li CH, Jia ZJ, Tang LS, Wu YC, Li Y. Effect of model of fertilization on microbial abundance and enzyme activity in oasis farmland soil. *Acta Pedologica Sinica*, 2012, 49 (3) : 567-574. (in Chinese)
李晨华, 贾仲君, 唐立松, 吴宇澄, 李彦. 不同施肥模式对绿洲农田土壤微生物群落丰度与酶活性的影响. *土壤学报*, 2012, 49 (3) : 567-574.
- [18] Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 2007, 88: 1354-1364.
- [19] Chu H, Fierer N, Lauber CL, Caporaso JG., Knight R, Grogan P. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental Microbiology*, 2010, 12 (11) : 2998-3006.
- [20] Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103 (3) : 626-631.
- [21] Fierer N, Schimel JP, Holden PA. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35 (1) : 167-176.

Effect of long-term fertilizing regime on soil microbial diversity and soil property

Chenhua Li¹, Caixia Zhang^{2,3}, Lisong Tang^{1*}, Zhengqin Xiong², Baozhan Wang³
Zhongjun Jia³, Yan Li¹

¹ State Key Laboratory of Desert and Oasis Ecology, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, Xinjiang Autonomy, China

² Nanjing Agricultural University, Institute of Resource, Ecosystem and Environment of Agriculture, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

³ State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To evaluate the effect of long-term fertilization on soil microbial community and soil chemical and physical properties. [Methods] Using a high-throughput pyrosequencing technique, we studied microbial community in the 0–300 cm soil samples covering a 20-year field-experiment with different fertilization applications including inorganic fertilizer alone (N 300 kg/hm², P₂O₅ 150 kg/hm² and K₂O 60 kg/hm²) and inorganic fertilizer combined with straw (same application rate of N and P fertilizer combined with 5.4 t straw). [Results] Actinobacteria and α -proteobacteria were the predominant groups in the topsoil (0–20 cm). As the soil depth increased, the relative abundance of actinobacteria decreased whereas that of proteobacteria, especially γ -proteobacteria and β -proteobacteria increased and gradually became the dominant groups in the subsoil (20–300 cm). Long-term fertilizing applications significantly affected soil microbial communities throughout the soil profile, and increased the relative abundance of ammonia-oxidizing archaea at 0–40 cm depth. In addition, agriculture management, e. g. irrigation may be an important driving factor for the distribution of ammonia-oxidizing bacteria in soil profile. Total nitrogen and organic carbon contents were the most influential factors on microbial community in the topsoil and in the subsoil, respectively. [Conclusion] Long-term fertilizer applications altered soil nutrient availability within the soil profile, which was likely to result in the different microbial community structure between the fertilizer treatments, especially for the subsoil.

Keywords: soil profile, microbial community, next-generation sequencing, long-term fertilizer, oasis farmland

(本文责编: 张晓丽)