

## 土壤灭菌方式对不同深度土壤养分和微生物群落结构的影响

陶禹, 李雪峰, 张竹青, 张清壮, 李鑫

### 引用本文:

陶禹, 李雪峰, 张竹青, 张清壮, 李鑫. 土壤灭菌方式对不同深度土壤养分和微生物群落结构的影响[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(3): 575–584.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0641>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 四种生物炭对潮土土壤微生物群落结构的影响

陈义轩, 宋婷婷, 方明, 于志国, 李洁, 赖欣, 张贵龙

农业环境科学学报. 2019, 38(2): 394–404 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0966>

#### 钝化材料对农田土壤Cd形态及微生物群落的影响

兰玉书, 袁林, 杨刚, 程蓉, 石楷岐, 高本汗

农业环境科学学报. 2020, 39(12): 2743–2751 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0637>

#### 不同碳氮磷源改良剂对铅锌尾矿废弃地土壤微生物群落结构的影响

杨胜香, 李凤梅, 彭禧柱, 曹建兵, 高智席

农业环境科学学报. 2019, 38(6): 1256–1264 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-1594>

#### 有机质添加对铅污染农田土生态功能稳定性的影响研究

杨惠子, 陈明龙, 周怡然, 李璇, 穆清, 王丽娜, 王贵鑫, 张园

农业环境科学学报. 2017, 36(4): 694–701 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1383>

#### 不同钝化机制矿物对土壤重金属的钝化效果及微生物响应

任露陆, 蔡宗平, 王固宁, 叶志钧, 张艳林, 曹美苑

农业环境科学学报. 2021, 40(7): 1470–1480 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1436>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

陶禹, 李雪峰, 张竹青, 等. 土壤灭菌方式对不同深度土壤养分和微生物群落结构的影响[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(3): 575-584.

TAO Y, LI X F, ZHANG Z Q, et al. Effects of soil disinfestation methods on nutrients and microbial community structure in different soil depths[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(3): 575-584.



开放科学 OSID

# 土壤灭菌方式对不同深度土壤养分和微生物群落结构的影响

陶禹, 李雪峰, 张竹青, 张清壮, 李鑫\*

(湖南省蔬菜研究所, 长沙 410000)

**摘要:**土壤强还原灭菌技术(Reductive soil disinfestation, RSD)是一种缓解连作障碍的有效手段,目前关于它对土壤微生物群落结构与活性影响的研究很多,但对于不同RSD处理下,不同深度土壤微生物群落结构的差异及其与环境因子的联系关注很少。为在一定程度上说明RSD改良缓解连作障碍的基本原理,并为后续研究人员采用微生物手段改良土壤质量、防治土壤连作障碍提供研究基础,本研究通过土壤理化性质检测和高通量测序技术比较了不同土壤灭菌方式对土壤养分和微生物群落的影响。结果表明:RSD处理能有效提高土壤中全氮、全钾和全磷含量,并促进有效磷、速效钾等土壤速效养分在土壤中的转化积累。同时,根据群落与环境因子关联分析,发现土壤深度、全氮、有效磷和交换态镁等环境因子共同驱动了Chloroflexi、Actinobacteria、Ascomycota、Basidiomycota、Mortierellomycota等菌门丰度变化,其中土壤深度差异是造成微生物群落结构差异的最主要原因。群落功能预测表明,RSD能有效提高浅层土壤中细菌的碳水化合物代谢、萜类与多酮类化合物代谢等功能丰度,并促进深层土壤中土壤腐生真菌、木质腐生真菌和枯落物腐生真菌的定殖。综上所述,RSD能有效提高土壤养分积累并驱动微生物群落结构与功能变化,有利于农田土壤地力提升与生态可持续发展。

**关键词:**土壤深度;土壤强还原;群落分析;功能预测

中图分类号:S158;S154.3;S472 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2022)03-0575-10 doi:10.11654/jaes.2021-0641

## Effects of soil disinfestation methods on nutrients and microbial community structure in different soil depths

TAO Yu, LI Xuefeng, ZHANG Zhuqing, ZHANG Qingzhuang, LI Xin\*

(Hunan Vegetable Research Institute, Changsha 410000, China)

**Abstract:** Reductive soil disinfestation (RSD) is an effective technology for alleviating continuous cropping obstacles. Currently, there are many studies on the influence of RSD on the structure and activity of soil microbial communities. However, the effects of soil depth on soil microbial community structure and its connection to environmental factors under different RSD treatments have not been effectively investigated. This study aimed to evaluate the basic principles of RSD treatments to alleviate continuous cropping challenges, provide a basis for further research to improve soil quality, and prevent soil continuous cropping challenges by using molecular biotechnologies. This study compared the effects of different soil sterilization methods on soil nutrients and microbial communities through testing of soil physicochemical properties and high-throughput sequencing. The results showed that RSD treatments increased the nitrogen, potassium, and phosphorus contents in the soil, and promoted the transformation and accumulation of soil available nutrients such as available potassium and phosphorus. Meanwhile, association analysis revealed that soil physicochemical properties such as soil depth, total nitrogen, available phosphorus, and exchangeable magnesium combined to effect changes in the abundance of the phyla Chloroflexi, Actinobacteria,

收稿日期:2021-06-03 录用日期:2021-09-13

作者简介:陶禹(1991—),男,湖北十堰人,博士,助理研究员,从事土壤微生物研究。E-mail:ty123@webmail.hzau.edu.cn

\*通信作者:李鑫 E-mail:s2007203272@yeah.net

基金项目:湖南省自然科学基金项目(2020JJ5313);湖南省科技成果转化及产业化计划项目(2020NK2005);长沙市科技计划项目(kq2004041)

Project supported: The Natural Science Foundation of Hunan Province, China (2020JJ5315); The Program of Science and Technology Achievements Transformation and Industrialization of Hunan Province, China (2020NK2005); The Program of Changsha Science and Technology (kq2004041)

Ascomycota, Basidiomycota, and Mortierellomycota, among others. According to the association analysis of community and soil physicochemical properties, the soil depth was the primary factor influencing soil microbial community structure. Community function prediction indicated that RSD could effectively improve the bacterial abundance in shallow soils through improvement in metabolic activities such as carbohydrate; and promote colonization of soil saprophytic fungi, woody saprophytic fungi, and litter saprophytic fungi in deep soils. In summary, RSD treatments could effectively increase soil nutrients and change the structure and function of the microbial community by improving soil fertility and sustainable ecological development.

**Keywords:** soil depth; reduction soil disinfestation; community analysis; functional prediction

随着人们对农产品需求的不断扩大,集约化种植已成为我国农业生产的普遍趋势。然而,由于耕地面积的有限性,使得我国广泛存在长期的连续种植<sup>[1]</sup>,并由此带来了土壤酸化、肥力流失等土壤连作障碍问题<sup>[2]</sup>。尤其在辣椒<sup>[3]</sup>、人参<sup>[4]</sup>、西瓜<sup>[5]</sup>等作物的种植中普遍存在。

为了解决土壤连作带来的各种问题,研究人员提出了多种处理方式,如高温暴晒、土壤化学试剂熏蒸<sup>[6]</sup>、肥料开发<sup>[5]</sup>等。尽管这些方法都能对改善土壤连作障碍起到一定的效果,但高温暴晒和肥料开发的作用周期长、受环境条件影响大,化学试剂熏蒸可能会对环境造成二次污染<sup>[7-8]</sup>。在这种背景下,研究人员提出了土壤强还原灭菌方法(Reductive soil disinfestation, RSD)。该方法是在作物种植前,通过添加大量易分解有机物料,同时进行灌溉与薄膜覆盖,隔绝土壤与大气间的气体交换,快速创造厌氧强还原环境来改善土壤质量<sup>[8]</sup>。通过RSD处理能有效缓解土壤酸化和盐碱化,降解化感自毒物质,提高土壤微生物活性并重组微生物群落结构,显著改善单一连作造成的土壤问题<sup>[9]</sup>。现有研究表明,RSD已成功在日本、荷兰等国家应用,并有效缓解土豆、茄子和秋葵等多种粮食和经济作物种植过程中出现的连作障碍<sup>[7,10-11]</sup>。

RSD能有效缓解连作障碍,一方面是通过提高土壤养分含量,促进土壤肥力积累。曹明等<sup>[12]</sup>发现在强还原条件下,通过秸秆还田措施,土壤中碱解氮、速效磷和速效钾含量分别提高了67.73%、147.89%和49.23%。石磊等<sup>[13]</sup>发现小麦秸秆作为有机物料进行土壤强还原处理,土壤全氮和有机质含量可提升12.8%和3.4%。另一方面,RSD能通过重构微生物群落,促进有益微生物定殖。如李云龙等<sup>[14]</sup>研究发现土壤强还原处理能够显著消减土壤中皂苷类物质的含量,杀灭尖孢镰刀菌并显著降低其在真菌类群中的比例,同时提高再植三七的存苗率,降低发病率。PORET-PETERSON等<sup>[15]</sup>发现RSD处理能有效推动优

势菌群的重构,如Bacteroidales、Clostridiales、Selenomonadales和Enterobacteriales等菌门丰度在处理后显著升高;LIU等<sup>[16]</sup>发现RSD处理可以提高土壤对*Flavisolibacter*、*Gracilibacter*和*Peziza*等潜在有益微生物的亲性和,促进西瓜的健康生长。

微生物作为RSD处理过程中的主要参与者,通过分解添加的有机物,参与自然界养分的循环利用,进而提高土壤肥力,改善土壤结构,缓解土壤连作障碍<sup>[17-18]</sup>。然而,目前有关RSD处理影响土壤微生物群落结构与活性的研究大多着眼于不同有机物料投入后,土壤pH、有机物的碳氮比、腐植酸含量等因素驱动下的土壤微生物群落结构变化<sup>[10,19-20]</sup>,而对于不同土壤灭菌处理下不同深度土壤微生物群落结构的差异及其与环境因子的联系关注很少。

本研究通过土壤理化性质检测探究不同土壤灭菌处理对不同深度土壤养分的影响;通过高通量测序技术明确不同土壤灭菌方式对微生物群落结构与功能的改变;通过生物信息学分析手段进行环境因子与群落数据的关联分析,阐明RSD处理对不同深度土壤微生态的影响。期望通过本研究为RSD技术的应用提供实践依据,并在一定程度上为实际农业生产的可持续发展提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试物料

本研究通过旋耕机向土壤添加的物料包括棉隆溶液、豆渣及甘蔗渣。试验中棉隆为南通施壮有限公司生产;豆渣和甘蔗渣总碳含量分别为403.4 g·kg<sup>-1</sup>和420.8 g·kg<sup>-1</sup>,全氮含量分别为22.75 g·kg<sup>-1</sup>和5.03 g·kg<sup>-1</sup>。豆渣和甘蔗渣在加入土壤之前,都经干燥、粉碎并过50目筛。

### 1.2 田间实验

大田实验于2020年5—8月在湖南省常德市汉寿县蔬菜产业园进行。大田实行人工管理,确保除土壤灭菌处理差异外无其他区别。田间共设置6个实验

小区分别进行不同的处理,每个处理设置3个重复。其中,CK为空白处理,即土壤不做任何处理;HL为淹水覆膜处理,即将土壤充分灌溉至饱和后采用塑料薄膜进行覆膜处理,造成厌氧环境;DZ是向土壤中添加浓度为 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的棉隆溶液( $20\text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$ )后,再进行淹水覆膜处理;SB、BD和MM是采用“添加有机物+覆膜+淹水”创造强还原条件修复土壤的RSD处理,即分别向土壤中按 $20\text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$ 的比例添加甘蔗渣、豆渣和两者等比例混合的有机物料,再进行淹水覆膜处理。处理时长为20 d,处理期间温度为 $30\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。处理结束后,揭开薄膜,待土壤表面自然风干至无明显水分时分别在土壤浅层 $0\sim 15\text{ cm}$ 和深层 $15\sim 30\text{ cm}$ 取样,浅和深层土壤分别以“S”和“D”标记。其中,用于土壤理化性质检测的土壤在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,用于微生物群落检测的土壤在取样时以液氮处理后存放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

### 1.3 土壤理化性质测定

本研究中土壤pH、全氮、全磷、全钾、碱解氮、有效磷、速效钾、有机质和交换态镁等基本理化性质依照《土壤农化分析》中的国标方法进行测定。其中,土壤pH采用pH计测定;全氮采用元素分析仪测定;全磷采用碱熔-钼锑抗比色法测定;全钾采用火焰光度计测定;水解性氮采用扩散法测定;有效磷和速效钾采用联合浸提比色法测定;有机质采用重铬酸钾氧化-容量法测定;土壤阳离子交换量采用乙酸铵交换法测定;交换态钙、镁采用乙酸铵提取-火焰原子吸收分光光度法测定。

### 1.4 土壤DNA提取与群落检测

土壤微生物基因组总DNA利用E.Z.N.A.<sup>®</sup> soil DNA kit(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)试剂盒,根据操作说明书提取。所有样品选择16S rRNA基因高变区序列进行细菌群落测序,测序引物为338F-806R,测序区域为V3~V4区;所有真菌样本选择ITS 5F-ITS 2R作为基因引物,测序区域为ITS1区。测序完成后,将相同组的平行样本测序结果进行统计并分析。

### 1.5 数据统计与分析

使用Fastqc(0.19.6)进行序列质量控制后,以97%的序列相似性将剩余序列聚类到OTU中。此后使用QIIME软件将序列与Silva和Unite数据库比对,并在各分类学水平统计样群的群落物种组成。根据统计的OTU表采用Origin 9完成门水平丰度图绘制。采用Mothur(1.30.2)软件分别计算基于群落丰富度和多样性的Chao1和Shannon指数。后续主坐标分析

(PCoA)、置换多元方差分析、相关性热图采用Vegan和pheatmap等R语言软件包完成。通过分析不同样本中群落结构和组成的变化,确定微生物与环境因素之间的相关性。此外,分别采用Tax4Fun及FUNGuild对细菌和真菌群落进行功能预测。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理对土壤化学性质与养分含量的影响

土壤化学性质与养分含量测定结果见表1。由表可知,与CK相比,HL处理的各指标在不同土壤深度均无显著差异;DZ处理下,深层土壤中全钾、水溶性氮、有效磷、速效钾、有机质含量等略有升高( $P>0.05$ );RSD处理(BD、SB和MM)的浅层土壤中,全氮、全磷、有效磷和速效钾含量都有所提高,而阳离子交换量显著下降;在深层土壤中,全钾含量显著上升( $P<0.05$ )。此外,RSD处理后,不同深度土壤的养分含量表现出不同趋势。全钾在浅层土壤中降低,而在深层土壤中升高;BD处理下全氮、速效钾在浅层土壤中明显升高( $P<0.05$ );交换态镁在浅层土壤中降低。

### 2.2 微生物群落变化

根据主成分分析结果,不同处理结果的细菌与真菌群落差异显著。不同处理的浅层土壤细菌群落相对分散,而深层土壤的细菌群落相对集中(图1a);不同处理的浅层土壤真菌群落相对集中,而深层土壤中的真菌群落相对分散(图1b)。这说明不同的土壤处理诱导浅层细菌和深层真菌群落发生了较大改变。

细菌门水平丰度图(图2a)表明,深层土壤中的细菌门类主要集中于Proteobacteria、Chloroflexi、Actinobacteria、Gemmatimonadetes和Acidobacteria,且相对丰度无明显变化;浅层土壤中的主要菌门包括Proteobacteria、Chloroflexi、Actinobacteria和Firmicutes等,其中Chloroflexi、Actinobacteria的相对丰度波动较大。对于真菌(图2b),在浅层土壤中,Ascomycota是所有处理中最主要的组成菌门(75.54%~99.59%);而在深层土壤中,主要的组成菌门则还包括Basidiomycota和Mortierellomycota。从不同处理方式来看,浅层土壤中,Firmicutes在所有处理中的相对丰度都有所提高,而Rokubacteria在RSD处理后有所下降;此外,HL处理还提高了浅层土壤中Actinobacteria的相对丰度,降低了Gemmatimonadetes、Acidobacteria、Bacteroidetes的相对丰度;DZ处理提高了浅层土壤中Chloroflexi和Actinobacteria的相对丰度,降低了Gemmatimonade-

表1 土壤化学性质与养分含量变化  
Table 1 The changes of soil chemical properties and nutrient contents

处理 Treatment	pH	阳离子交换量 Cation exchange capacity/ ( $\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	交换态镁 Exchangeable magnesium/ ( $\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	交换态钙 Exchangeable calcium/ ( $\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	全氮 Total nitrogen/ ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	全磷 Total phosphorus/ ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	全钾 Total potassium/ ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	水溶性氮 Water-soluble nitrogen/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	有效磷 Available phosphorous/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	速效钾 Available potassium/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	有机质 Organic matter/ ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
S_CK	6.20±0.35a	14.10±0.10a	8.08±1.27a	15.10±1.53ab	1.43±0.07bcd	1.06±0.14abc	24.07±0.79a	91.67±12.78abc	199.77±60.13abc	371.00±148.54bc	18.21±2.19abcd
S_HL	6.00±0.26a	13.60±0.25ab	6.79±1.23abcd	15.97±2.48ab	1.26±0.11cdef	1.12±0.06ab	24.10±0.43a	76.33±8.82c	185.73±38.65abcd	359.33±138.39bc	19.53±4.03ab
S_DZ	5.97±0.32a	14.10±0.50a	7.14±1.65ab	18.86±5.2ab	1.54±0.14abc	0.98±0.06abcd	23.65±0.51a	118.00±5.03abc	209.57±32.07ab	356.00±113.12bc	16.49±1.36abcd
S_BD	6.57±0.22a	12.70±0.06bc	6.96±0.13abc	28.01±7.38a	1.76±0.11a	1.23±0.14a	23.45±0.69a	147.33±48.88a	251.07±63.66a	812.67±234.19a	19.85±1.19a
S_SB	6.35±0.57a	12.90±0.32b	6.87±0.83abcd	16.97±3.21ab	1.67±0.08ab	1.11±0.13ab	23.22±0.44a	110.33±19.55abc	208.20±20.84ab	637.00±148.11ab	18.35±0.29abcd
S_MM	6.20±0.21a	12.77±0.55bc	6.74±0.81abcd	27.77±4.28a	1.69±0.12ab	1.19±0.07a	23.49±0.22a	140.67±27.39ab	274.47±27.55a	637.00±98.76ab	18.64±1.38abc
D_CK	6.50±0.10a	12.60±0.38bc	4.53±0.15bcde	12.94±0.88b	1.03±0.04f	0.70±0.02d	20.12±0.09d	68.00±1.00c	80.97±15.68d	125.00±15.50c	13.27±0.66cd
D_HL	6.37±0.12a	12.60±0.06bc	4.93±0.69bcde	13.32±2.26b	1.12±0.07ef	0.78±0.02cd	20.14±0.30d	68.67±5.49c	97.93±13.75cd	147.00±35.56c	12.89±1.25d
D_DZ	6.43±0.38a	13.37±0.15ab	4.19±0.36de	13.80±3.03b	1.15±0.03def	0.80±0.10cd	21.21±0.58cd	90.00±10.60abc	110.23±23.44bcd	168.67±22.85c	14.06±1.01bcd
D_BD	6.50±0.38a	13.03±0.15ab	4.03±0.30e	16.62±5.98ab	1.30±0.07cdef	0.85±0.04bcd	23.13±0.39ab	85.67±0.88bc	81.27±13.88d	275.33±110.03bc	16.22±1.34abcd
D_SB	6.40±0.47a	11.67±0.71c	4.37±0.14de	15.63±5.03ab	1.32±0.08cde	0.90±0.09bcd	23.96±0.44a	82.67±4.67bc	115.07±22.02bcd	215.00±67.76c	15.69±0.67abcd
D_MM	6.43±0.20a	12.47±0.39bc	4.03±0.19e	14.21±1.52b	1.31±0.04cdef	0.89±0.04bcd	21.75±0.38bc	85.67±6.36bc	106.97±14.03bcd	218.33±11.29c	14.70±0.49abcd

注: 同列不同字母表示处理间差异显著 ( $P<0.05$ )。

Note: Different letters in a column indicate significant differences among treatments at  $P<0.05$ .

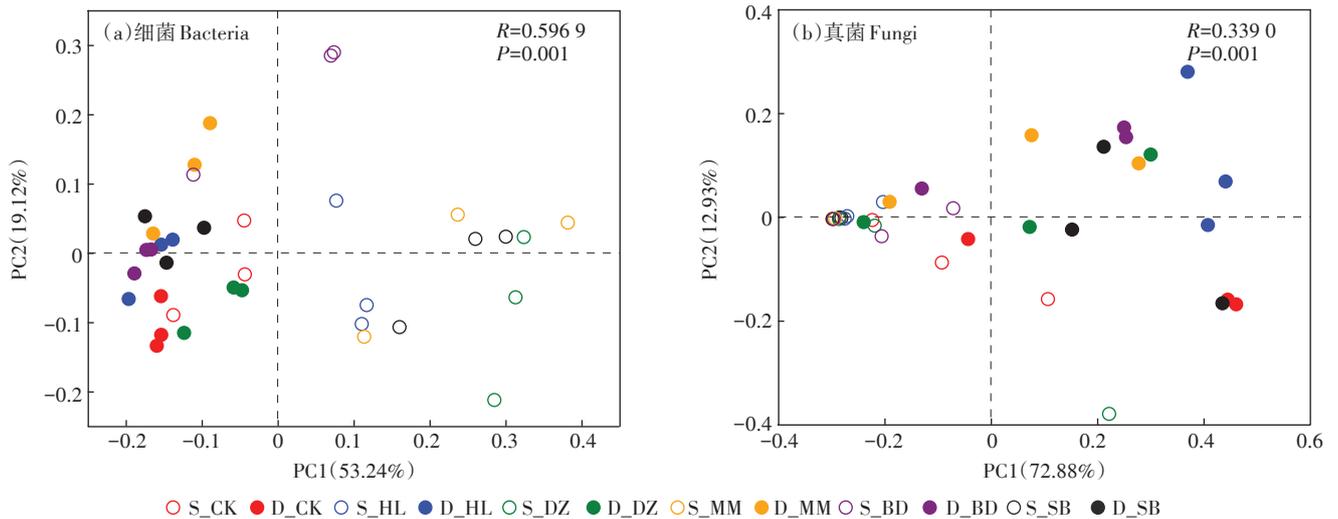


图1 微生物群落主成分分析图  
Figure 1 The principal component analysis of microbial community

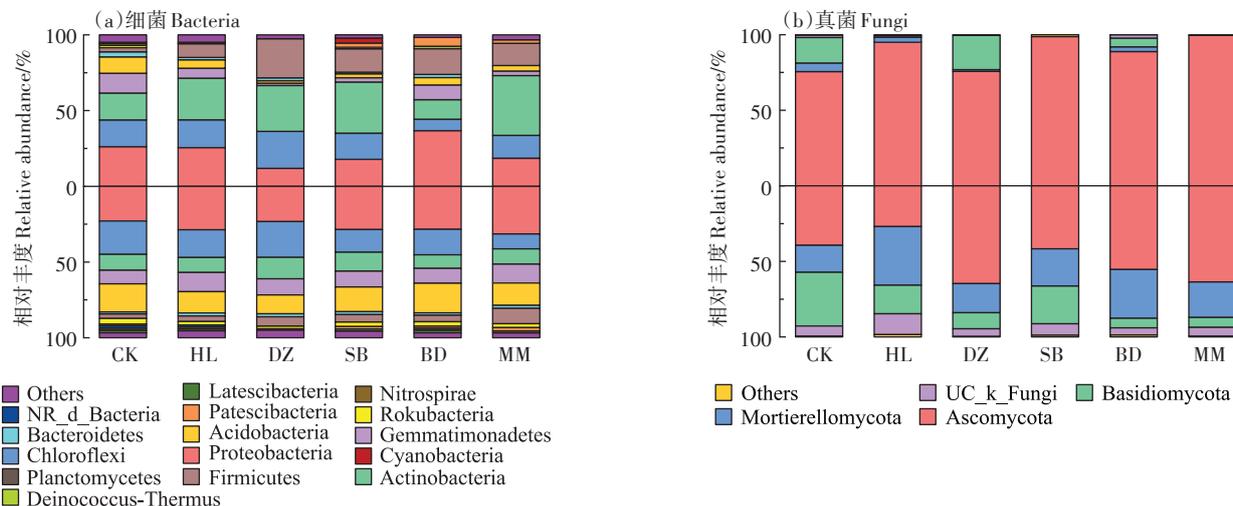
tes、Acidobacteria、Bacteroidetes 的相对丰度; RSD 处理提高了 Patescibacteria 的相对丰度。

### 2.3 群落结构变化与环境因子的相关性分析

冗余分析 (Redundancy analysis, RDA) 的结果表明, 土壤深度与菌门 Chloroflexi、Acidobacteria、Gemmatimonadetes、Proteobacteria、Mortierellomycota、Basidiomycota 的丰度呈正相关; 与菌门 Patescibacteria、Firmicutes、Actinobacteria、Ascomycota 的丰度呈负相关 (图 3a 和 3b)。此外, 不同深度样本的 RDA 分析结果表明, 对不同深度土壤微生物群落影响最大的因子不同。对浅层土壤细菌群落结构影响最大的因子是

交换态钙、全钾和交换态镁 (图 3c); 对深层细菌群落结构影响最大的环境因子为全氮、全磷、速效钾和有机质含量 (图 3e)。对于真菌群落, 浅层土壤的最主要影响因子为全磷、有效磷、水溶性氮和交换态镁 (图 3d); 深层土壤的影响因子为有效磷、水溶性氮和阳离子交换量 (图 3f)。

置换多元方差分析 (Permutational Multivariate Analysis of Variance, PERMANOVA) 发现造成群落组成差异显著的影响因素众多 (表 2)。在细菌方面, 土壤深度、全氮、全磷、水溶性氮、有效磷、速效钾、交换态钙和交换态镁对其群落组成的影响达到极显著水平



坐标轴上部为浅层土壤群落丰度,下部为深层土壤群落丰度。相对丰度 < 1% 的归类到“其他”

The upper and lower parts of the coordinate axis represent the relative abundances of shallow and deep soil communities, respectively. Percent of community relative abundance < 1% is classified as “others”

图2 不同灭菌处理对土壤门水平群落结构组成的影响

Figure 2 Effects of different soil disinfection treatments on community structure at phylum level

( $P < 0.01$ ); 而真菌方面,其群落组成受到土壤深度、阳离子交换量、全氮、有效磷、交换态镁极显著影响( $P < 0.01$ )。同时对细菌和真菌群落组成都具有显著影响的是土壤深度、全氮、有效磷和交换态镁( $P < 0.05$ ),其中土壤深度均达极显著水平( $P < 0.01$ )。

基于置换多元方差分析结果,进一步分析了不同显著影响因子与总体丰度前 50 菌属的 Pearson 相关性并构建热图,见图 4。结果显示,不论是细菌还是真菌,菌属与土壤深度的相关性基本与它跟全氮、有效磷和交换态镁的相关性相反,这与 RDA 的分析结果相同。同时,对这 4 个因素同时响应的显著影响菌属主要来自于菌纲 Actinobacteria (*UC\_f\_Nocardiodaceae*、*Nocardioideis*、*NR\_f\_67-14*、*Streptomyces*)、Deltaproteobacteria (*NR\_f\_Bacteriap25*、*NR\_o\_NB1-j*)、Gammaproteobacteria (*NR\_f\_TRA3-20*、*MND1*)、Eurotiomycetes (*Aspergillus*、*Arachniotus*) 和 Sordariomycetes (*Plectosphaerella*、*Acrophialophora*)。

## 2.4 微生物群落功能变化

细菌基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 功能预测表明各样本细菌群落的 KEGG 二级功能主要归属于 5 个方面,包括代谢 (61.36%~66.34%, 11 条途径)、环境信息处理 (16.31%~18.26%, 2 条途径)、遗传信息处理 (11.12%~11.90%, 3 条途径)、细胞进程 (2.47%~4.28%, 2 条途径) 和人类疾病 (0.96%~1.27%, 1 条途径),且不同的土壤灭菌处理对细菌群落功能丰度的影响存在相对差异。从图 5 可以看出,在浅层土壤中,与 CK 相比,

各处理的细菌细胞活力、细胞生长与凋亡、信号转导等功能类别的丰度普遍降低;膜运输、碳水化合物代谢、外源性物质的生物降解与代谢、萜类与多酮类化合物代谢等功能丰度普遍升高。而在深层土壤中,与其他处理相比,DZ 处理造成细胞运动、膜运输、信号转导、碳水化合物代谢等功能丰度发生显著改变( $P < 0.05$ )。

此外,根据真菌群落注释,无论浅层还是深层,腐生营养型真菌是整个真菌群落最主要的构成部分 (40.52%~90.04%)。其中,浅层土壤中除未定义腐生真菌外,各种腐生真菌在处理均呈现下降趋势;深层土壤中,土壤腐生真菌、木质腐生真菌、枯落物腐生真菌在 RSD 处理后丰度都显著提升。同时,棉隆溶液处理的土壤中,除去未定义腐生真菌,其他各类腐生真菌相对丰度较 CK 都显著降低;HL 处理有助于深层土壤中土壤腐生真菌和枯落物腐生真菌的富集。

## 3 讨论

单一连续种植是造成我国农业种植土壤连作障碍的主要原因。现有研究表明种植模式优化、配施肥料改良、土壤综合防治措施等多种方式可以有效缓解土壤连作障碍,但很少有研究尝试通过重构土壤中的微生物群落来达到控制连作障碍的目的。此外,深度是土壤的关键属性之一,它决定了土壤含水量、养分储存和矿物质储备等一系列影响植株生长的条件<sup>[21]</sup>。但是,在当前 RSD 技术的实际应用研究中,对不同土壤深度受处理影响的微生物群落分析关注较少。本研究通过开展微生物与土壤养分的关联分析,提高对

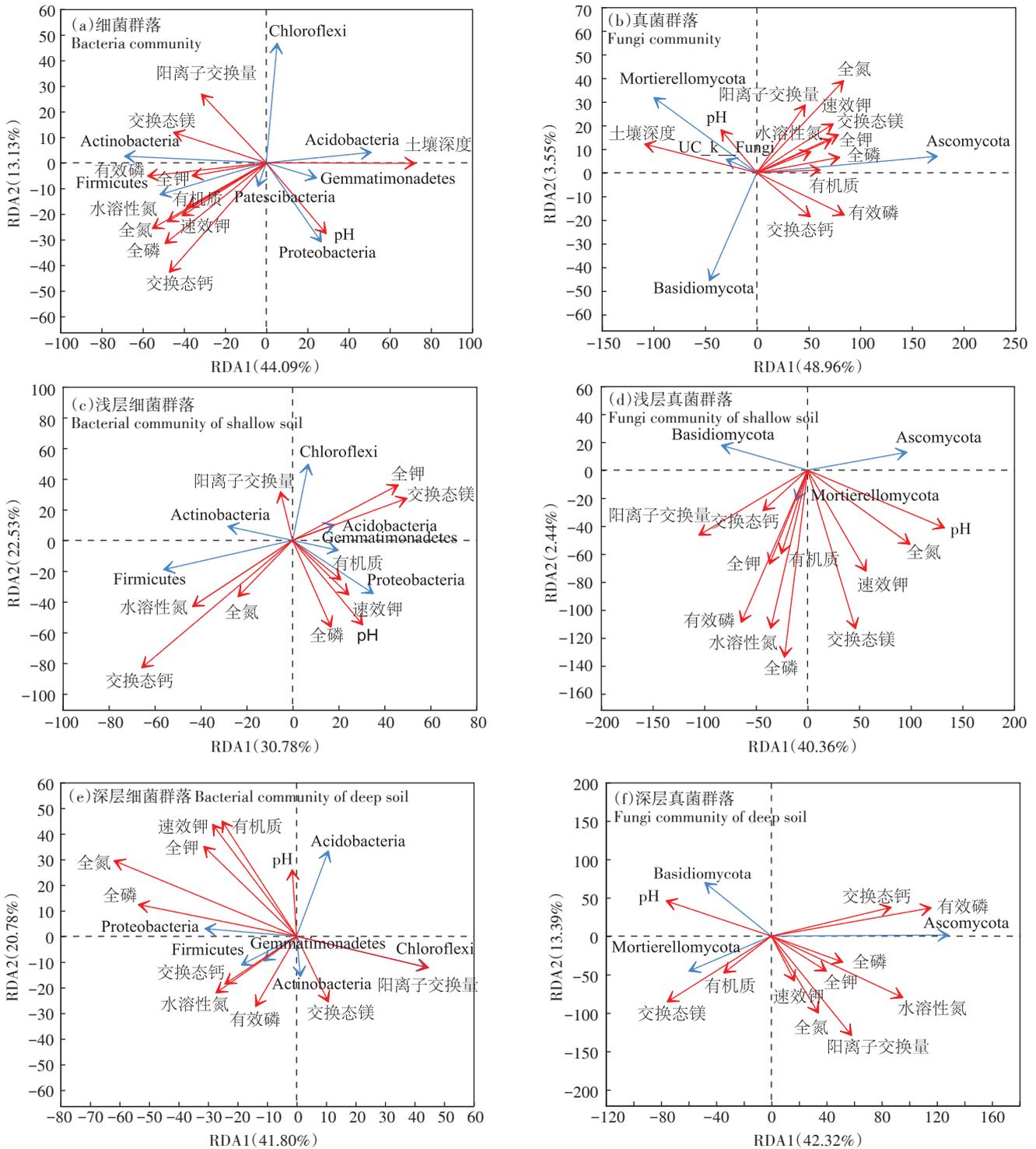


图3 主要菌门与环境因子冗余分析图

Figure 3 The RDA analysis between major microorganism phylum and environment factors

土壤强还原基本原理的认知,并为土壤质量改良、土壤连作障碍防治的实际问题提供解决方案。

本研究通过土壤理化性质检测和高通量测序技术比较了不同土壤灭菌方式(空白对照、淹水覆膜、添加棉隆溶液处理和3个RSD处理)对土壤养分和微生物群落的影响,发现有效磷、速效钾和交换态镁等多种土壤营养元素受不同土壤灭菌方式的显著影响,与CK相比,HL与DZ处理后的土壤养分无显著差异;RSD处理后全钾、全氮、全磷、速效钾和交换态镁含量在不同深度土壤之间存在差异。棉隆施用后整体营

物群落的影响,发现有效磷、速效钾和交换态镁等多种土壤营养元素受不同土壤灭菌方式的显著影响,与CK相比,HL与DZ处理后的土壤养分无显著差异;RSD处理后全钾、全氮、全磷、速效钾和交换态镁含量在不同深度土壤之间存在差异。棉隆施用后整体营

表2 环境因子置换多元方差分析  
Table 2 The PERMANOVA of environment factors

因子 Factor	细菌 Bacteria				真菌 Fungi			
	均方 Mean square	F	R <sup>2</sup>	P 值 P value	均方 Mean square	F	R <sup>2</sup>	P 值 P value
土壤深度	0.701	21.564	0.388	0.001	2.246	10.531	0.236	0.001
pH	0.155	3.184	0.086	0.037	0.476	1.793	0.050	0.100
有机质	0.202	4.287	0.112	0.013	0.669	2.574	0.070	0.028
阳离子交换量	0.160	3.293	0.088	0.03	0.889	3.510	0.094	0.009
全氮	0.473	12.062	0.262	0.001	0.977	3.896	0.103	0.005
全磷	0.358	8.413	0.198	0.002	0.914	3.622	0.096	0.010
全钾	0.178	3.711	0.098	0.026	0.743	2.887	0.078	0.014
水溶性氮	0.352	8.218	0.195	0.002	0.438	1.644	0.046	0.121
有效磷	0.448	11.208	0.248	0.001	1.225	5.032	0.129	0.002
速效钾	0.273	6.048	0.151	0.003	0.793	3.095	0.083	0.011
交换态钙	0.360	8.469	0.199	0.002	0.681	2.626	0.072	0.025
交换态镁	0.304	6.889	0.168	0.001	1.206	4.946	0.127	0.002

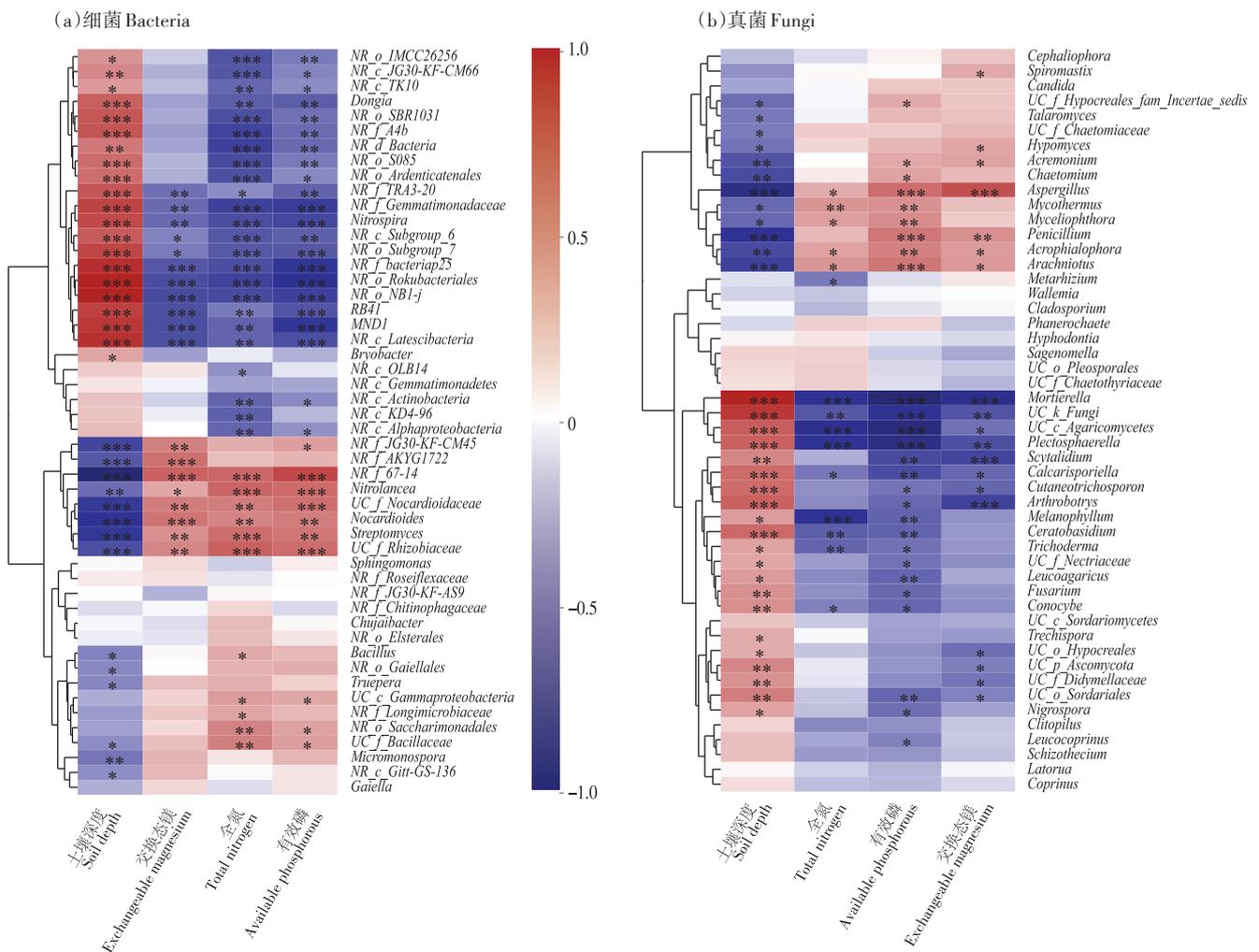


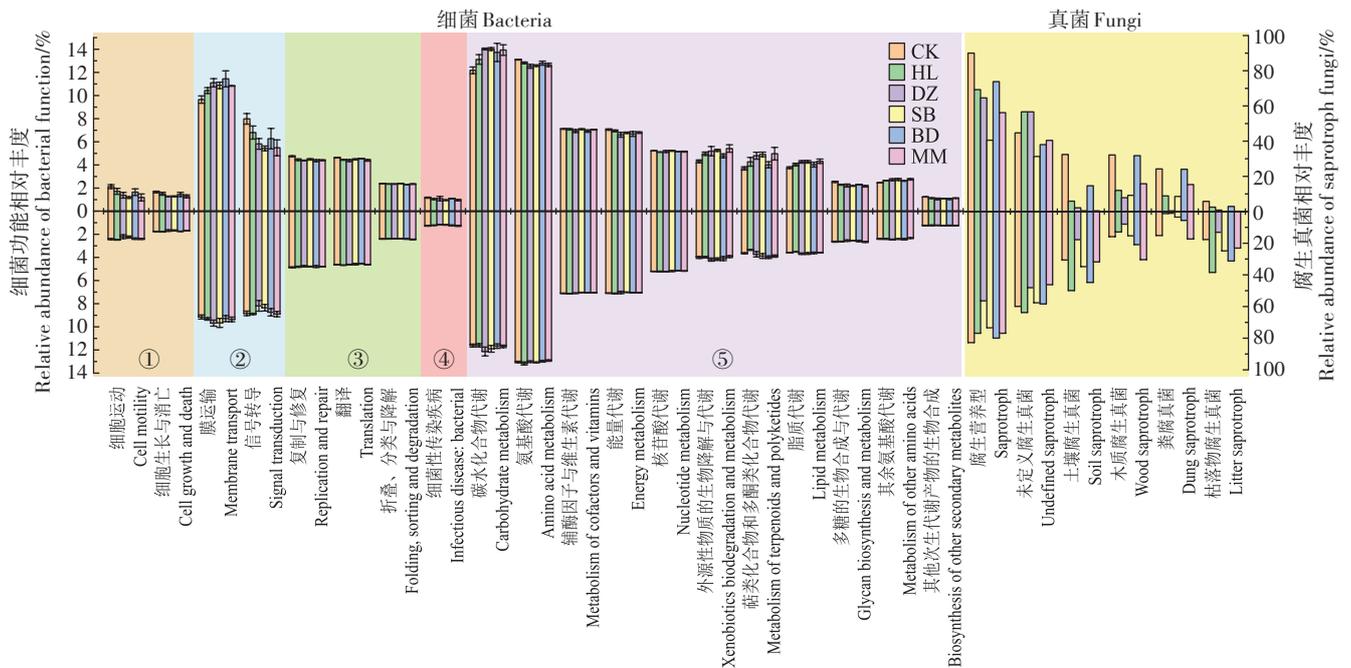
图4 环境因子与主要菌属相关性热图

Figure 4 The correlation heat map between environmental factors and major genera

养元素与CK无显著差异,这和运翠霞等<sup>[22]</sup>的报道一致。而由微生物群落变化导致的土壤有效磷等物质的增加将有助于土壤肥力保持<sup>[23-24]</sup>。LIU等<sup>[25]</sup>采用RSD处理(添加豆渣)土壤后,土壤中速效钾含量由388.4 mg·kg<sup>-1</sup>增加到402.1 mg·kg<sup>-1</sup>,这与本研究的结果相似。此外,深层土壤中,全钾含量也显著上升。SONG等<sup>[26]</sup>的研究表明RSD处理后土壤中钾升高的主要来源是RSD处理过程中豆渣和蔗渣分解向环境中释放的钾。土壤阳离子交换量的变化说明RSD处理改变了土壤营养元素交换能力<sup>[27]</sup>,这两种改变共同促进了微生物与钾的充分接触,从而促进了钾在土壤中的转化<sup>[25]</sup>。此外,浅层土壤中交换态镁降低,这将有助于减少土壤中根结线虫等虫害的发生<sup>[28]</sup>。

微生物对环境因子适应性响应有效推动了群落的结构变化,而群落变化的显著差异菌属也与环境因子具有明显的关联。在本研究中,土壤深度作为最主要的影响因子,造成了多个菌属丰度的显著变化,而这些显著差异菌属在之前的研究中也被发现。例如周利等<sup>[29]</sup>在研究稻田土壤中硝酸盐异化还原成铵(DNRA)细菌群落结构的垂向分布规律及其与环境因子的关系时发现,DNRA细菌更多地存在于表层土壤(0~20 cm)中,丰度最低值出现在深层土壤(90~

100 cm)中,表层样品群落结构的多样性大于深层样品;KOIZUMI等<sup>[30]</sup>的研究发现菌属*Nitrospira*的丰度与土壤深度呈正相关;GRISHKAN等<sup>[31]</sup>在研究西班牙塔韦纳斯沙漠北坡和日照平原区不同地表类型下0~30 cm土壤中微形真菌的深度分布时发现,真菌属*Aspergillus*和*Penicillium*作为大量产生小的薄壁孢子的浅色真菌,能在1~5 cm和10~20 cm土壤中成为优势菌属。除去土壤深度,本研究发现大量菌属丰度对全氮和有效磷的含量变化发生响应,而这些菌属与自然界氮磷循环相关。例如,LI等<sup>[32]</sup>发现*Nitrospira*具有较强的硝化能力,在施用氮肥后的农业土壤自养氨氧化中具有潜在的重要作用,其生活方式可能不受贫营养条件的严格限制。与之类似,FANG等<sup>[33]</sup>发现*Nitrolancea*作为硝化菌能参与自然界氮循环并促进1,3-二氯丙烯等熏蒸剂在田间的分解。VIBBER等<sup>[34]</sup>发现菌属*Nocardioides*能在农田土壤中大量繁殖,并以阿特拉津作为氮源,减少农药残留。NELOFER等<sup>[35]</sup>发现*Aspergillus*可以作为增磷菌,大量产生有机酸以及磷酸酶和植酸酶,将土壤中不可利用的磷转化为有效磷。而菌属*Arthrotrrys*也被发现可以产生β-植酸酶,促进矿物中磷的释放,在饲料加工中具有改善谷物和动物饲料营养价值的潜力<sup>[36]</sup>。



坐标轴上部为浅层土壤群落丰度,下部为深层土壤群落丰度。细菌群落功能:①细胞进程;②环境信息处理;③遗传信息处理;④人类疾病;⑤代谢 The upper and lower parts of the coordinate axis represent the relative abundances of shallow and deep soil communities, respectively. Bacterial community function: ① Cellular processes; ② Environmental information processing; ③ Genetic information processing; ④ Human diseases; ⑤ Metabolism

图5 微生物群落结构的功能注释

Figure 5 Function annotations for microbial community structures

微生物群落对生境变化的响应可以通过群落功能的改变进行观测。本研究中,棉隆溶液处理土壤后,多种腐生真菌相对丰度都显著降低,这是由于棉隆是一种广谱杀菌剂,其施用会造成包括大量有益微生物在内的土壤微生物减少。同时,研究发现细胞活动、细胞生长与凋亡、信号转导等细胞进程相关功能的丰度降低,这是不同处理过程中营造的厌氧环境使得大量好氧和兼性厌氧菌株消亡,群落整体丰度下降造成的<sup>[37]</sup>。此外,细菌群落的碳水化合物代谢、外源性物质的生物降解与代谢、萜类与多酮类化合物代谢等功能丰度在所有RSD处理的浅层土壤中也显著提升<sup>[38]</sup>。碳水化合物代谢和外源性物质的生物降解这两个细菌功能丰度的提升,是由于细菌群落向特定的有机物分解的方向发展而出现的适应性改变,这在深层真菌功能预测中也有所体现<sup>[39]</sup>。深层土壤中,土壤腐生真菌、木质腐生真菌、枯落物腐生真菌在RSD处理后丰度都显著提升。

#### 4 结论

(1)本研究通过比较不同的土壤灭菌方式对土壤的影响,发现土壤强还原灭菌技术(RSD)处理中添加的有机物能有效提高土壤中全氮、全钾和全磷含量,微生物能促进有效磷、速效钾等土壤养分在土壤中的转化积累,从而提高肥力。

(2)不同土壤深度下,添加不同有机物料的RSD处理间微生物群落结构存在差异。各处理浅层土壤中的主要差异菌门为Chloroflexi、Actinobacteria和Ascomycota,深层土壤中的主要差异菌门则包括Basidiomycota和Mortierellomycota。

(3)土壤深度、全氮、有效磷和交换态镁等环境因子同时驱动细菌和真菌群落变化,其中土壤深度差异是最主要驱动因素。

(4)RSD处理形成的新生境能改变微生物群落自身的功能丰度。RSD处理能有效提高浅层土壤中细菌的碳水化合物代谢、外源性物质的生物降解与代谢、萜类与多酮类化合物代谢等功能丰度,并促进深层土壤中土壤腐生、木质腐生、枯落物腐生等腐生营养型真菌的富集。

#### 参考文献:

[1] ZHAO J, ZHOU X, JIANG A, et al. Distinct impacts of reductive soil disinfection and chemical soil disinfection on soil fungal communities and memberships[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(17):7623-7634.

[2] 黄新琦, 蔡祖聪. 土壤微生物与作物土传病害控制[J]. 中国科学院院刊, 2017, 32(6):593-600. HUANG X Q, CAI Z C. Soil microbes and control of soil-borne diseases[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2017, 32(6):593-600.

[3] GAO J, PEI H, XIE H. Synergistic effects of organic fertilizer and corn straw on microorganisms of pepper continuous cropping soil in China [J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1):1258-1268.

[4] TONG A, LIU W, LIU Q, et al. Diversity and composition of the *Panax ginseng* rhizosphere microbiome in various cultivation modes and ages [J]. *BMC Microbiology*, 2021, 21(1):18.

[5] DING S, ZHOU D, WEI H, et al. Alleviating soil degradation caused by watermelon continuous cropping obstacle: Application of urban waste compost[J]. *Chemosphere*, 2021, 262:128387.

[6] 卢志军, 陈明远, 黄健, 等. 土壤化学熏蒸剂在根结线虫防治中的应用[J]. 中国植保导刊, 2016, 36(9):59-64. LU Z J, CHEN M Y, HUANG J, et al. Application of soil chemical fumigant in root-knot nematode control[J]. *China Plant Protection*, 2016, 36(9):59-64.

[7] KHADKA R B, MARASINI M, RAWAL R, et al. Effects of anaerobic soil disinfection carbon sources on soilborne diseases and weeds of okra and eggplant in Nepal[J]. *Crop Protection*, 2020, 135:104846.

[8] 蔡祖聪, 张金波, 黄新琦, 等. 强还原土壤灭菌防控作物土传病的应用研究[J]. 土壤学报, 2015, 52(3):469-476. CAI Z C, ZHANG J B, HUANG X Q, et al. Application of reductive soil disinfection to suppress soil-borne pathogens[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52(3):469-476.

[9] 宋同彬, 孟天竹, 蔡祖聪, 等. 强还原方法对退化设施蔬菜地土壤的修复[J]. 应用生态学报, 2013, 24(9):2619-2624. ZHU T B, MENG T Z, CAI Z C, et al. Effects of strong reductive approach on remediation of degraded facility vegetable soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(9):2619-2624.

[10] LIU L, KONG J, CUI H, et al. Relationships of decomposability and C/N ratio in different types of organic matter with suppression of *Fusarium oxysporum* and microbial communities during reductive soil disinfection[J]. *Biological Control*, 2016, 101:103-113.

[11] MESSIHA N A S, VAN DIEPENINGEN A D, WENNEKER M, et al. Biological soil disinfection (BSD), a new control method for potato brown rot, caused by *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2007, 117(4):403-415.

[12] 曹明, 张雪彬, 陶凯, 等. 强还原条件下秸秆还田量对南繁水稻土土壤肥力和微生物数量的影响[J]. 热带农业科学, 2019, 39(10):95-99. CAO M, ZHANG X B, TAO K, et al. Effect of amount of paddy straw forced incorporated into paddy field on soil fertility and number of microorganisms in paddy soil in winter[J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2019, 39(10):95-99.

[13] 石磊, 赵洪海, 李明亮, 等. 土壤强还原处理对根结线虫数量、番茄生长及土壤性质的影响[J]. 生态学杂志, 2018, 37(6):1865-1870. SHI L, ZHAO H H, LI M L, et al. Effects of strong reductive approach on root-knot nematodes, the growth of tomato and soil physicochemical properties[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, 37(6):1865-1870.

[14] 李云龙, 王宝英, 蔡祖聪, 等. 土壤强还原处理对三七连作障碍因子及再植三七生长的影响[J]. 土壤学报, 2019, 56(3):703-715.

- LI Y L, WANG B Y, CAI Z C, et al. Effects of reductive soil disinfestation on obstacles and growth of replant seedlings in Sanqi ginseng mono-cropped soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56(3): 703-715.
- [15] PORET-PETERSON A T, ALBU S, MCCLEAN A E, et al. Shifts in soil bacterial communities as a function of carbon source used during anaerobic soil disinfestation[J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2019, 6:160.
- [16] LIU L, CHEN S, ZHAO J, et al. Watermelon planting is capable to restructure the soil microbiome that regulated by reductive soil disinfestation[J]. *Applied Soil Ecology*, 2018, 129:52-60.
- [17] LI X, LI X, LI Y, et al. Improved immobilization of soil cadmium by regulating soil characteristics and microbial community through reductive soil disinfestation[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 778:146222.
- [18] 朱文娟, 王小国. 强还原土壤灭菌研究进展[J]. *土壤*, 2020, 52(2): 223-233. ZHU W J, WANG X G. Advances in method of reductive soil disinfestation[J]. *Soils*, 2020, 52(2):223-233.
- [19] 朱睿. 强还原土壤处理方案选择及对杂草抑制效果的研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2017. ZHU R. Optimizing reductive soil disinfestation and suppression effect on weed germination[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2017.
- [20] HUANG X, WEN T, ZHANG J, et al. Toxic organic acids produced in biological soil disinfestation mainly caused the suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense[J]. *BioControl*, 2015, 60(1):113-124.
- [21] YOST J L, HARTEMINK A E. How deep is the soil studied: An analysis of four soil science journals[J]. *Plant and Soil*, 2020, 452(1/2): 5-18.
- [22] 运翠霞, 严昌荣, 徐明泽, 等. 不同消毒方式对土壤酶活性及土传病原真菌消减的影响[J]. *中国农业大学学报*, 2020, 25(12): 86-96. YUN C X, YAN C R, XU M Z, et al. Effects of different soil disinfestation methods on soil enzyme activities and soil-borne diseases[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2020, 25(12): 86-96.
- [23] ZHU F, XIAO J, ZHANG Y, et al. Dazomet application suppressed watermelon wilt by the altered soil microbial community[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10:21668.
- [24] 朱文达, 颜冬冬, 李林, 等. 棉隆土壤消毒防除小麦田杂草的效果及对养分的影响[J]. *湖北农业科学*, 2020, 59(6):100-103. ZHU W D, YAN D D, LI L, et al. Effect of dazomet soil disinfestation on weed control nutrient and yield in wheat field[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2020, 59(6):100-103.
- [25] LIU X, XIAO R, LI R, et al. Bioremediation of Cd-contaminated soil by earthworms (*Eisenia fetida*): Enhancement with EDTA and bean dregs[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 266:115191.
- [26] SONG X, LIU F, WU H, et al. Effects of long-term K fertilization on soil available potassium in East China[J]. *Catena*, 2020, 188:104412.
- [27] 范庆锋, 虞娜, 张玉玲, 等. 设施蔬菜栽培对土壤阳离子交换性能的影响[J]. *土壤学报*, 2014, 51(5):1132-1137. FAN Q F, YU N, ZHANG Y L, et al. Effects of facility vegetable cultivation on soil cation exchange performance[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2014, 51(5): 1132-1137.
- [28] 施河丽, 彭五星, 左梅, 等. 湖北恩施烟区长期连作烟田影响南方根结线虫密度的土壤理化特性分析[J]. *烟草科技*, 2020, 53(12): 9-15. SHI H L, PENG W X, ZUO M, et al. Soil physical and chemical characteristics influencing *Meloidogyne incognita* density in long-term continuous tobacco growing fields in Enshi, Hubei[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2020, 53(12):9-15.
- [29] 周利, 宋以萍, 周杰民, 等. 稻田硝酸盐异化还原成铵细菌群落结构的垂向分布特性[J]. *环境科学学报*, 2020, 40(3):1029-1039. ZHOU L, SONG Y P, ZHOU J M, et al. Vertical distribution of community composition of dissimilatory nitrate reduction to ammonium bacteria in paddy soils[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2020, 40(3):1029-1039.
- [30] KOIZUMI Y, KOJIMA H, FUKUI M. Characterization of depth-related microbial community structure in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rDNA and reversely transcribed 16S rRNA fragments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 46(2):147-157.
- [31] GRISHKAN I, LÁZARO R, KIDRON G J. Vertical divergence of cultivable microfungi communities through biocrusted and bare soil profiles at the Tabernas Desert, Spain[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2020, 37(6):534-549.
- [32] LI C, HU H, CHEN Q, et al. Comammox *Nitrospira* play an active role in nitrification of agricultural soils amended with nitrogen fertilizers[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 138:107609.
- [33] FANG W, YAN D, WANG Q, et al. Changes in the abundance and community composition of different nitrogen cycling groups in response to fumigation with 1, 3-dichloropropene[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 650:44-55.
- [34] VIBBER L L, PRESSLER M J, COLORES G M. Isolation and characterization of novel atrazine-degrading microorganisms from an agricultural soil[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(4): 921-928.
- [35] NELOFER R, SYED Q, NADEEM M, et al. Isolation of phosphorus-solubilizing fungus from soil to supplement biofertilizer[J]. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 2016, 41(6):2131-2138.
- [36] HOU X, SHEN Z, LI N, et al. A novel fungal beta-propeller phytase from nematophagous *Arthrobotrys oligospora*: Characterization and potential application in phosphorus and mineral release for feed processing[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19:84.
- [37] 张逸飞, 钟文辉, 蔡祖聪, 等. 长期不同施肥处理对红壤水稻土酶活性及微生物群落功能多样性的影响[J]. *生态与农村环境学报*, 2006, 22(4): 39-44. ZHANG Y F, ZHONG W H, CAI Z C, et al. Effects of long-term different fertilization on soil enzyme activity and microbial community functional diversity in paddy soil derived from quaternary red clay[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2006, 22(4):39-44.
- [38] STROMBERGER M, KLOSE S, AJWA H, et al. Microbial populations and enzyme activities in soils fumigated with methyl bromide alternatives[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2005, 69(6): 1987-1999.
- [39] 闫冰, 付嘉琦, 夏嵩, 等. 厌氧氨氧化启动过程细菌群落多样性及 PICRUSt2 功能预测分析[J]. *环境科学*, 2021, 42(8): 3875-3885. YAN B, FU J Q, XIA S, et al. Diversity and PICRUSt2-based predicted functional analysis of bacterial communities during the start-up of ANAMMOX[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(8):3875-3885.