

王喜英,赵 辉,谭智勇,等. 设施菜地种植年限对土壤 *nosZ* 型反硝化微生物群落结构和丰度的影响[J]. 江苏农业科学,2022,50(9):240-247.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.09.038

设施菜地种植年限对土壤 *nosZ* 型反硝化微生物群落结构和丰度的影响

王喜英,赵 辉,谭智勇,余 高

(铜仁学院,贵州铜仁 554300)

摘要:反硝化微生物在土壤氮素损失和温室气体转化方面具有重要的作用,研究设施菜地土壤反硝化微生物群落结构和数量变化,对评价设施菜地长期种植土壤质量状况和提高氮转化认知水平具有重要意义。应用荧光定量 PCR 和 Illumina Miseq 高通量测序技术,以 *nosZ* 基因为靶标,研究设施菜地种植 3、5、7 年和露天菜地(CK)对土壤反硝化微生物群落结构和数量的影响。结果表明:露天菜地(CK) *nosZ* 基因丰度显著高于其他处理,分别是 3、5、7 年的 1.32 倍、1.45 倍和 1.69 倍。随种植年限延长,*nosZ* 基因丰度逐渐降低。不同处理土壤反硝化微生物群落 α 多样性指数差异显著, α 多样性指数随种植年限延长逐渐降低,且露天菜地(CK)的 Chao1 指数和 ACE 指数最高。门水平上优势类群为变形菌门;属水平上优势类群为慢生根瘤菌属和无色杆菌属;变形菌门和慢生根瘤菌属相对丰度随设施种植年限延长逐渐降低。主成分分析(PCA)结果表明,随种植年限延长 *nosZ* 群落结构差异较大;其中 3 年和 5 年群落结构相似,7、3、5 年群落结构差异较大。土壤速效钾、铵态氮和硝态氮含量是 *nosZ* 型反硝化微生物数量、 α 多样性和群落结构的主要影响因素。综上可知,设施菜地长期种植显著降低了 *nosZ* 型反硝化微生物数量,并对群落结构有显著影响。

关键词:设施菜地;种植年限;反硝化微生物;*nosZ* 基因;群落结构

中图分类号:S182

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2022)09-0240-07

设施蔬菜是现代农业集约化发展的一个重要分支,对提高自然资源利用率和增加农民收入具有重要的意义。随着人口的不断增长和对蔬菜消费需求的增加以及有限的耕地资源,设施蔬菜在过去的 40 年里得到了高度发展^[1]。截至 2016 年,我国设施蔬菜种植面积已达 387 多万 hm^2 ,位居世界第一,产值占蔬菜总产值的 50% 以上^[2]。然而,设施蔬菜具有种植指数高、农业投入大、棚内温湿度较高的封闭或半封闭环境,且无雨水淋溶等特点。因此,设施蔬菜长期种植已经引起了人们对土壤质量退化、土壤和蔬菜潜在污染以及对人类健康的负面

影响的担忧^[3-4]。

土壤微生物在土壤生态系统中起着养分循环、有机质转化、污染物降解和土传病害防治等作用^[5]。相关研究认为,设施蔬菜长期种植对土壤微生物群落结构和功能有负面影响,主要指从细菌为主到以真菌为主的群落演替,功能相关微生物群落成员和物种相互作用的减少,导致一些土传病原菌替代了对生态有益的微生物群落^[6-9]。目前,研究者更多关注的是土壤微生物群落的整体变化或某些选定的与土传病害有关的微生物。由于土壤微生物具有高度的结构和功能多样性,不同类型的土壤生物过程由所涉及的功能群微生物驱动完成。迄今为止,在设施蔬菜生产中,土壤功能微生物对蔬菜长期生产的响应仍然知之甚少,尤其是与养分循环相关的微生物。

氮(N)是植物生长的主要限制因子,土壤氮有效性在决定植物氮素吸收和产量方面起着重要作用^[10]。氮转化主要包括氮固定、矿化、硝化和反硝化过程^[11]。反硝化作用产生的温室气体(N_2O)是大气臭氧的主要消耗物质,变暖潜力是二氧化碳的 298 倍^[12]。其中,由土壤微生物驱动的反硝化作用对调节氮循环及维持全球氮平衡起着重要的作

收稿日期:2021-08-01

基金项目:贵州省教育厅自然科学研究项目(编号:黔教合 KY 字[2020]163);铜仁学院博士科研启动基金(编号:tyxyDH2002);铜仁学院农业生态创新研究项目(编号:CXTD[2020-10]);绿色农药与农业生物工程教育部重点实验室开放基金(编号:黔教合 KY 字[2019]036);贵州省教育厅青年科技人才成长项目(编号:黔教合 KY 字[2019]175)。

作者简介:王喜英(1981—),女,河南汝南人,硕士,讲师,研究方向为生物化学及生物信息学分析。E-mail:810315971@qq.com。

通信作者:赵 辉,博士,副教授,研究方向为土壤微生态及作物栽培。E-mail:yancao504@163.com。

用^[13]。 N_2O 主要由反硝化作用产生,耕地土壤是最大的来源^[14-15]。设施菜地由于投入大量氮肥和大水漫灌,导致土壤反硝化作用强烈, N_2O 释放通量比大田高 1.41 倍^[16]。因此,如何通过微生物来调控 N_2O 转化已经成为许多学者关注的焦点^[17-18]。目前,反硝化中唯一已知的是通过 *nosZ* 基因编码的 N_2O 还原酶还原 N_2O 的生物过程^[19]。在森林、草地和耕地中已开始利用 *nosZ* 基因来研究反硝化微生物群落结构和多样性^[20-21]。然而,关于设施蔬菜长期种植对土壤 *nosZ* 型反硝化微生物群落结构和数量的研究未见报道。

为此,本研究运用荧光定量 PCR 和 Illumina MiSeq 高通量测序技术对不同种植年限设施菜地土壤 *nosZ* 型反硝化微生物群落结构及丰度进行研究,主要目的在于:(1)随设施菜地种植年限延长,反硝化微生物群落结构和多样性如何变化? 有哪些优势类群发生变化?(2)设施蔬菜长期种植中,哪些土壤环境因子对反硝化微生物群落结构影响较大? 揭示设施蔬菜长期种植过程中的反硝化能力,为深入了解设施蔬菜土壤氮循环过程提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

试验样地位于贵州省铜仁市和平乡(109°07'44"E,27°46'46"N),属于亚热带季风气候,年均温 18 ℃,年降水量 1 313 mm,土壤类型为黄壤,有机碳含量为 22.32 g/kg,全氮含量为 1.05 g/kg, pH 值为 6.15,容重为 1.23 g/cm³。

1.2 试验设计

选择 3 个种植年限(3、5 和 7 年)设施大棚(长、宽规格分别为 8、40 m)各 3 个,以周围种植的露天蔬菜为对照(CK)。设施菜地基肥施用氮磷钾复合肥 80~100 kg/667 m²,追施氮肥 40~50 kg/667 m²。露天菜地施用基肥 40~50 kg/667 m²,追肥 20~30 kg/667 m²。设施大棚每年蔬菜种植类型一致,主要种植黄瓜和豇豆等。在整个试验处理中,除种植年限差异外,其余生产管理措施一致。

于 2017 年 7 月取样,当季种植的作物均为黄瓜,每个样地按“S”形(五点法)采集 0~10 cm 土壤样品,用低温冰盒保存带回实验室进行 2 mm 过筛处理。土样分为 3 份,一份新鲜土壤用于铵态氮和硝态氮含量测定;一份 -80 ℃ 冰箱保存用于 *nosZ* 基因群落结构和丰度分析;一份室内风干处理用于

土壤化学指标测定。

1.3 测定方法

1.3.1 土壤化学性质测定 采用鲍士旦的方法^[22]进行测定。土壤 pH 值采用电位法测定;有机碳(SOC)含量采用重铬酸钾氧化法测定;全氮(TN)含量采用凯氏定氮法测定;速效磷(AP)含量采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法测定;速效钾(AK)含量采用乙酸铵提取-火焰光度法测定;铵态氮(NH_4^+ -N)含量采用靛酚蓝比色法测定;硝态氮(NO_3^- -N)含量采用酚二磺酸比色法测定。

1.3.2 土壤 DNA 提取及 *nosZ* 基因扩增和荧光定量 PCR 称取 0.5 g 土壤,按照 E. Z. N. A.® Mag-Bind® Soil DNA Kit(Omega, GA, USA)试剂盒操作步骤提取土壤 DNA。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,用核酸定量仪(Nanodrop-NC2000)检测 DNA 浓度和纯度。采用引物 *nosZ*-F(5'-GGGC TBGGCCRTTGCA-3')与 *nosZ*-R(5'-GAAGCGR TCCTTSGARAACTTG-3')扩增 *nosZ* 基因高变区片段^[23]。

PCR 产物纯化回收后,将其连接至 pMD8-T 载体,转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中进行培养,筛选阳性克隆,提取 *nosZ* 基因重组质粒,质粒浓度经核酸定量仪测定后,计算基因拷贝数,按照 10 倍梯度稀释至 $10^3 \sim 10^8$ 拷贝数,制备标准曲线^[24]。

1.3.3 高通量测序 PCR 产物扩增后,样品送至上海派森诺生物科技有限公司,运用 Illumina MiSeq 测序平台进行测序。使用 QIIME 软件调用 UCLUST 序列比对工具,按照 97% 的序列相似度进行 OTU 划分和归并,并选取丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列。利用 QIIME 软件将 OTU 的代表序列与功能基因数据库进行比对,获取每个 OTU 对应的分类学信息。

1.4 数据分析

采用 SPSS 21.0 软件进行土壤化学性质、反硝化细菌 α 多样性指数、丰度和群落组成相对丰度的差异显著性分析($\alpha=0.05$)和相关性分析。采用 R 软件进行主成分分析和冗余分析。

2 结果与分析

2.1 土壤化学性质

由表 1 可知,不同设施菜地种植年限土壤 pH 值及有机碳、速效钾含量均显著小于 CK,随种植年限延长逐渐降低。种植 3、5、7 年土壤全氮、速效磷、

铵态氮和硝态氮含量均高于 CK。种植 5、7 年土壤全氮含量分别比 CK 显著增加 38.26%、51.30%，种植 3 年和 CK 差异不显著。不同处理土壤速效磷含

量大小顺序为 7 年>3 年>5 年>CK。土壤铵态氮和硝态氮含量随种植年限延长而增加，大小顺序为 7 年>5 年>3 年>CK。

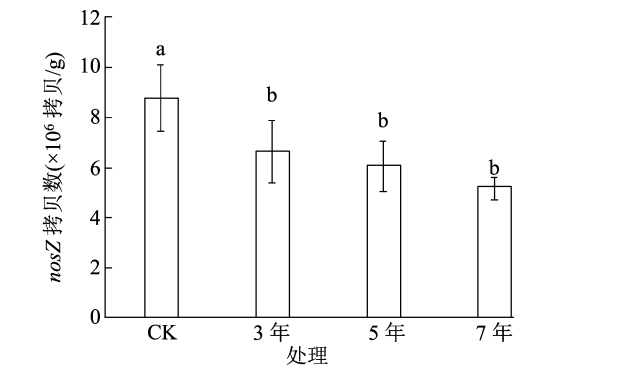
表 1 设施菜地种植年限土壤化学性质

处理	pH 值	有机碳含量 (g/kg)	全氮含量 (g/kg)	速效磷含量 (mg/kg)	速效钾含量 (mg/kg)	铵态氮含量 (mg/kg)	硝态氮含量 (mg/kg)
CK	6.22 ± 0.03a	23.35 ± 0.33a	1.15 ± 0.05c	13.83 ± 1.28c	215.23 ± 3.08a	7.66 ± 0.36d	8.43 ± 0.77d
3 年	5.52 ± 0.27b	21.49 ± 0.64b	1.20 ± 0.02c	28.91 ± 1.81a	176.51 ± 8.24b	14.48 ± 1.27c	18.76 ± 1.38c
5 年	4.82 ± 0.04c	20.85 ± 0.29b	1.59 ± 0.04b	22.38 ± 0.68b	130.91 ± 3.13c	17.74 ± 1.37b	24.39 ± 1.34b
7 年	4.53 ± 0.06c	17.75 ± 0.33c	1.74 ± 0.05a	31.42 ± 0.42a	87.25 ± 2.08d	21.56 ± 1.07a	30.67 ± 2.33a

注:表中数值为平均值 ± 标准差(n=3)。同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著(P<0.05)。表 2 同。

2.2 nosZ 基因丰度

由图 1 可知,不同设施菜地种植年限土壤 nosZ 基因拷贝数变化范围为 5.19 × 10⁶ ~ 8.78 × 10⁶ 拷贝/g。不同设施种植年限 nosZ 基因拷贝数均显著小于 CK(P<0.05),CK 分别是设施种植 3、5、7 年的 1.32 倍、1.45 倍、1.69 倍。设施种植 3、5、7 年的 nosZ 基因拷贝数之间差异不显著,随种植年限延长逐渐降低。



柱状图上不同小写字母表示各处理在 0.05 水平上差异显著(P<0.05)
图1 设施蔬菜种植年限土壤nosZ基因丰度

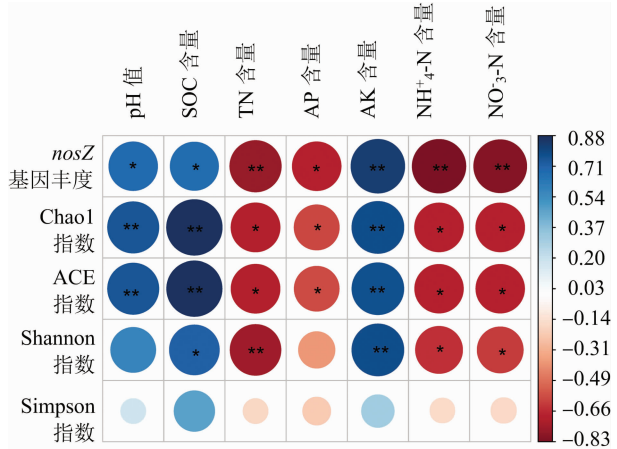
为明确 nosZ 基因丰度差异的影响因素,由 nosZ 基因丰度与土壤化学性质进行相关性分析。由图 2 可知,nosZ 基因丰度分别与土壤 pH 值和有机碳含量呈显著正相关(P<0.05);与土壤全氮、铵态氮和硝态氮含量呈极显著负相关(P<0.01);与速效磷含量呈显著负相关(P<0.05);与速效钾含量呈极显著正相关(P<0.01)。

2.3 nosZ 型反硝化微生物 α 多样性指数

由表 2 可知,Chao1 指数和 ACE 指数变化趋势相同,范围分别为 1 057.51 ~ 1 423.84 和 1 070.06 ~ 1 429.96,各设施蔬菜种植年限的 Chao1 指数和 ACE 指数均小于 CK,随种植年限延长而逐渐降低。Shannon 指数和 Simpson 指数范围为 6.20 ~ 7.02 和

0.82 ~ 0.86,种植 7 年均显著小于其他处理(P<0.05)。Shannon 指数在种植 3 年时最高,大小顺序为 3 年>CK>5 年>7 年。Simpson 指数在种植 5 年时最高,大小顺序为 5 年>3 年>CK>7 年。

由相关性分析(图 2)可知,Chao1 指数和 ACE 指数分别与土壤 pH 值、有机碳和速效钾含量呈极显著正相关(P<0.01);与全氮、速效磷、铵态氮和硝态氮含量呈显著负相关关系(P<0.05)。Shannon 指数与土壤有机碳含量呈显著正相关(P<0.05);与全氮含量呈极显著负相关(P<0.01);与速效钾含量呈极显著正相关(P<0.01);与铵态氮和硝态氮呈显著负相关(P<0.05)。



*、** 分别表示在 0.05、0.01 水平上显著相关
图2 nosZ基因丰度、多样性指数与土壤化学性质的相关性分析

2.4 nosZ 群落组成

由图 3 可知,通过对样品获得的 nosZ 群落 OTUs 进行归类,在门水平上共获得 6 个类群,分别为变形菌门(Proteobacteria)、Bacteria_unclassified、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)和绿弯菌门(Chloroflexi)。不同设施蔬菜种植年限土壤变形

表 2 设施菜地种植年限土壤 *nosZ* 型反硝化细菌 α 多样性指数

处理	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
CK	1 423.84 \pm 65.53a	1 429.96 \pm 60.49a	7.02 \pm 0.08a	0.84 \pm 0.01b
3 年	1 358.68 \pm 73.93a	1 366.93 \pm 77.77a	7.18 \pm 0.24a	0.85 \pm 0.02ab
5 年	1 305.40 \pm 97.92a	1 312.08 \pm 98.23a	6.96 \pm 0.10a	0.86 \pm 0.01a
7 年	1 057.51 \pm 154.83b	1 070.06 \pm 157.58b	6.20 \pm 0.32b	0.82 \pm 0.02c

菌门、Bacteria_unclassified、酸杆菌门和绿弯菌门相对丰度差异显著或极显著。变形菌门、Bacteria_unclassified 和芽单胞菌门为主要优势类群,相对丰度范围为 62.27% ~ 70.42%、16.66% ~ 25.19% 和 2.88% ~ 3.82%。种植 5、7 年的变形菌门相对丰度均小于 CK, 分别比 CK 降低 2.69%、10.34%。Bacteria_unclassified 相对丰度在种植 7 年中最高, 显著高于种植 3 年和 5 年。芽单胞菌门相对丰度在 3 年中最高, 种植 5 年中最低, 大小顺序为 3 年 > 7 年 > CK > 5 年。设施菜地种植年限对变形菌门有抑制作用, 随种植年限增加抑制作用增强。

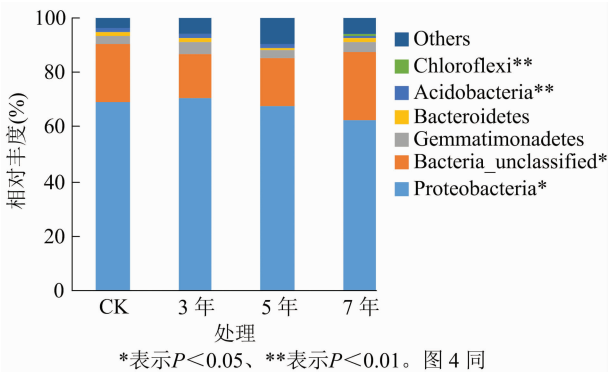


图3 设施菜地种植年限土壤 *nosZ*型反硝化细菌门水平组成

在属水平上, 可得到平均相对丰度 > 1% 的 10 个类群(图 4), 分别为慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、Bacteria_unclassified、无色杆菌属 (*Achromobacter*)、*Aromatoleum*、芽单胞菌属 (*Gemmatimonas*)、苍白杆菌属 (*Ochrobactrum*)、*Azoarcus*、固氮螺菌属 (*Azospirillum*)、中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*) 和红假单胞菌属 (*Rhodopseudomonas*)。其中慢生根瘤菌属、Bacteria_unclassified、无色杆菌属和红假单胞菌属相对丰度在不同设施蔬菜种植年限中差异显著或极显著。慢生根瘤菌属、Bacteria_unclassified 和无色杆菌属为主要优势类群, 相对丰度范围为 39.01% ~ 47.88%、18.48% ~ 27.68% 和 5.28% ~ 8.57%。慢生根瘤菌属相对丰度在不同设施种植年限均大于 CK, 分别是 CK 的 1.23 倍、1.12 倍、1.07 倍。无色杆菌属相对丰度在种植 7 年显著小于其他

处理, 大小顺序为 5 年 > CK > 3 年 > 7 年。*Aromatoleum* 相对丰度随设施蔬菜种植年限的延长逐渐增加, 种植 3 年和 5 年均小于 CK。

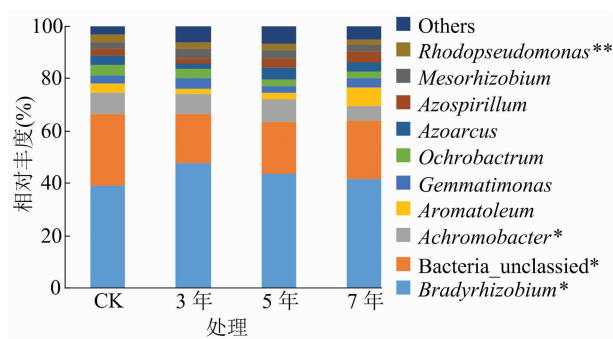


图4 设施菜地种植年限土壤 *nosZ*型反硝化细菌属水平组成

2.5 *nosZ* 群落结构及其与土壤化学性质的关系

通过对 *nosZ* 群落进行主成分分析(图 5)可知, 不同设施种植年限土壤 *nosZ* 群落结构差异明显, 第 1、第 2 主成分轴共解释了细菌群落结构变异的 69.94%, 其中第 1 主成分轴解释了总变异的 48.41%, 第 2 主成分轴解释了总变异的 21.53%。种植 7 年分别与种植 3、5 年在 PC1 和 PC2 上分离都较大, 说明随设施蔬菜种植年限延长, *nosZ* 群落结构变化较大; 种植 3、5 年的群落相聚较近, 说明群落相似度较大。

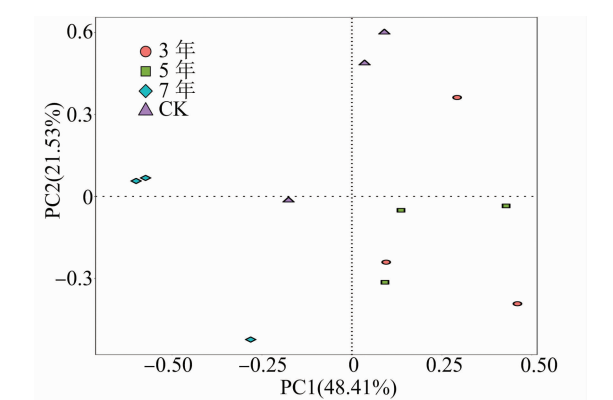


图5 设施菜地种植年限土壤 *nosZ*型反硝化细菌主成分分析

为分析土壤化学性质对 *nosZ* 群落结构的影响, 对 *nosZ* 群落结构与土壤化学指标进行冗余分析。由图 6 可知, 第 1 主轴能够解释所有信息的

46.61%,第2 主轴解释 22.44%,两者累计解释信息量达 69.05%。由此可知,前 2 轴很好地反映了 *nosZ* 群落组成与土壤化学性质的关系,且第 1 主轴作用较大。

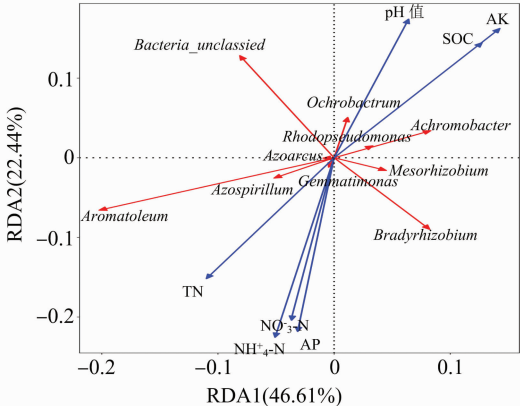


图6 *nosZ*群落与土壤化学性质的冗余分析

在属水平上,进一步对 *nosZ* 群落和土壤化学性质进行相关性分析(表 3)。Bacteria_unclassified 与土壤速效磷含量呈显著负相关($P < 0.05$)。无色杆菌属与土壤有机碳含量呈极显著正相关($P < 0.01$),与速效钾含量呈显著正相关($P < 0.05$)。Aromatoleum 与土壤有机碳含量和速效钾呈显著负相关,与全氮、铵态氮呈显著正相关($P < 0.05$),与速效钾呈显著负相关。苍白杆菌属与土壤 pH 值呈显著正相关($P < 0.05$)。固氮螺菌属与土壤全氮、铵态氮含量呈显著正相关,与速效钾含量呈显著负相关($P < 0.05$)。红假单胞菌属与土壤 pH 值、有机碳和速效钾含量呈极显著正相关($P < 0.01$),与全氮含量呈极显著负相关($P < 0.01$),与铵态氮和硝态氮含量呈显著负相关($P < 0.05$)。

表 3 *nosZ* 型反硝化细菌属水平优势菌群与土壤化学性质的相关性分析

属水平	相关系数						
	pH 值	SOC 含量	TN 含量	AP 含量	AK 含量	NH ₄ ⁺ - N 含量	NO ₃ ⁻ - N 含量
慢生根瘤菌属	-0.196	-0.055	-0.045	0.521	-0.076	0.228	0.211
Bacteria_unclassified	0.407	0.210	-0.196	-0.589 *	0.335	-0.503	-0.422
无色杆菌属	0.494	0.711 **	-0.486	-0.571	0.581 *	-0.523	-0.483
Aromatoleum	-0.420	-0.643 *	0.631 *	0.444	-0.667 *	0.581 *	0.538
芽单胞菌属	0.042	-0.094	-0.294	0.175	0.048	-0.029	-0.055
苍白杆菌属	0.613 *	0.509	-0.453	-0.437	0.496	-0.539	-0.517
Azorhizobium	-0.294	-0.127	0.478	-0.147	-0.290	0.303	0.260
固氮螺菌属	-0.463	-0.544	0.682 *	0.334	-0.653 *	0.609 *	0.568
中慢生根瘤菌属	-0.213	-0.066	-0.024	0.195	-0.028	0.145	0.194
红假单胞菌属	0.730 **	0.815 **	-0.784 **	-0.491	0.746 **	-0.681 *	-0.593 *

3 讨论与结论

长期种植设施蔬菜对土壤化学指标有显著影响,土壤全氮、铵态氮和硝态氮含量随设施种植年限增加而显著增加,同时也高于露天菜地(CK),可能由于设施栽培集约化种植,肥料持续高投入且长期连作限制植物生长,影响植物对养分的吸收,大部分养分在土壤中逐年积累^[25-26]。由本研究结果可知,设施菜地土壤有机碳含量低于露天菜地(CK),随种植年限延长逐渐降低,与前人研究结果^[27-28]相反,但与 Song 等的研究结果^[29]相似,可能与该区域很少施用有机肥及植物残体归还较少等因素有关。本研究中土壤 pH 值随种植年限延长逐渐降低,与许多研究结果^[30-31]相同,可能是由于长期过量施(氮)肥导致 SO₄²⁻ 和 NO₃⁻ 等不断积累,

最终引起土壤酸化增强。
反硝化作用主要由微生物驱动完成,与土壤施肥密切相关^[32]。本研究中,*nosZ* 数量随设施种植年限增加逐渐下降,且显著小于露天菜地(CK),可能由于设施蔬菜高水肥投入,土壤 pH 值降低,不利于微生物的 N₂O 还原酶组装,降低 N₂O 还原酶活性,导致微生物对 N₂O 还原能力下降^[33-34]。Hallin 等研究认为,*nosZ* 基因拷贝数随施氮量增加快速下降^[32]。本研究中 *nosZ* 基因丰度与土壤 pH 值、有机碳含量呈显著正相关,由于反硝化微生物为化能异养型生物,有机质可作为能量来源^[35]。Matlou 等研究认为,土壤有机碳含量与土壤微生物群落结构关系紧密,有机碳为土壤微生物活动提供需要的底物以及能量来源^[36]。在本研究,随设施蔬菜种植年限延长,土壤有机碳含量逐渐降低,不能为反硝化微

生物提供充足的能量来源。Bowden 等研究认为,土壤有机碳积累是因为微生物生物量减少导致^[37]。土壤 pH 值是反硝化微生物数量变化的主要环境因子^[38]。土壤 pH 值随设施蔬菜种植年限延长逐渐降低,土壤酸化会引起铁、铝等积累,铁、铝氢氧化物通过吸附土壤可溶性碳来降低微生物对碳源的利用^[39];土壤酸性越强, Al^{3+} 积累越多,对土壤细菌细胞膜损害越大^[40]。Bauhus 等研究表明,在酸性森林土壤中,添加磷可以促进土壤反硝化^[41]。本研究中,*nosZ* 基因拷贝数与速效磷含量呈显著相关,进一步支撑了土壤磷对反硝化微生物具有调控作用,然而关于磷如何调控反硝化微生物生长的机制仍不清楚。硝态氮可作为反硝化底物和反硝化过程的电子受体,影响反硝化微生物生长^[42]。本研究中,*nosZ* 反硝化微生物群落 α 多样性指数在各处理差异显著。Chao1 指数和 ACE 指数均是露天菜地 (CK) 最高,随种植年限延长逐渐降低,可能由于设施蔬菜长期种植,土壤酸化和盐渍化严重,导致土壤反硝化细菌物种丰度降低。Shannon 指数和 Simpson 指数是种植 3 年较高,7 年较低,随种植年限延长土壤反硝化微生物物种多样性降低;可能是由于设施蔬菜长期种植,导致土壤有机碳含量下降,不能为反硝化微生物生长提供丰富碳源。

nosZ 型反硝化细菌中优势类群均为变形菌门,与许多研究结果^[12,43] 一致。变形菌门的高低可反映土壤有机质等养分含量高低,同时在 pH 值较高的土壤环境中生长较好^[44]。本研究中,变形菌门丰度随种植年限延长表现出递降趋势,露天菜地 (CK) 和种植 3 年土壤最高,可能与土壤养分含量高及 pH 值较高有关,有利于变形菌门生长。属水平上共有优势类群为慢生根瘤菌属,相对丰度平均占 *nosZ* 基因序列的 43%。种植 3、5、7 年的慢生根瘤菌属相对丰度均大于露天菜地 (CK),随种植年限延长逐渐降低。

相关研究人员认为,反硝化微生物对施肥的反映差异性在于土壤 pH 值、全氮、铵态氮和硝态氮含量^[32]。土壤 pH 值被认为是影响反硝化微生物群落结构的主要因子,pH 值对反硝化微生物具有选择效应,其变化可以影响反硝化微生物的群落结构,并进而影响它们对环境变化的响应^[38]。本研究中,土壤 pH 值在不同处理中存在显著差异,并且土壤 pH 值与 *nosZ* 相对丰度之间存在显著相关关系,说明土壤 pH 值是引起反硝化微生物群落结构发生变化的主要因素。硝态氮是反硝化的底物,硝态氮含

量直接影响反硝化微生物的利用程度^[45]。

nosZ 基因丰度、Chao1 指数和 ACE 指数变化趋势一致,随种植年限延长逐渐降低。门水平上,变形菌门相对丰度占 *nosZ* 型反硝化微生物总量的 62.27% ~ 70.42%,是设施菜地土壤共有优势类群,在种植 3 年土壤中最高。属水平上,慢生根瘤菌属和无色杆菌属为共有优势类群。为准确评价设施土壤反硝化作用变化规律,需要开展长期试验,同时还需要对涉及反硝化途径的其他功能微生物群落进行研究。

参考文献:

- [1] Hu W Y, Zhang Y X, Huang B, et al. Soil environmental quality in greenhouse vegetable production systems in eastern China: current status and management strategies [J]. Chemosphere, 2017, 170: 183 - 195.
- [2] 荣勤雷. 有机肥/秸秆替代化肥模式对设施菜田土壤团聚体微生物特性的影响 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [3] 宁德富, 孔丽琼, 汤娜, 等. 不同种植年限蔬菜地土壤养分变化规律研究 [J]. 四川农业大学学报, 2016, 34 (1): 67 - 72.
- [4] Sun J T, Pan L L, Zhan Y, et al. Contamination of phthalate esters, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers in agricultural soils from the Yangtze River Delta of China [J]. Science of the Total Environment, 2016, 544: 670 - 676.
- [5] van der Heijden M G A, Wagg C. Soil microbial diversity and agro-ecosystem functioning [J]. Plant and Soil, 2013, 363 (1/2): 1 - 5.
- [6] Yao Z Y, Xing J J, Gu H P, et al. Development of microbial community structure in vegetable-growing soils from open-field to plastic-greenhouse cultivation based on the PLFA analysis [J]. Journal of Soils and Sediments, 2016, 16 (8): 2041 - 2049.
- [7] Li X G, Ding C F, Zhang T L, et al. Fungal pathogen accumulation at the expense of plant-beneficial fungi as a consequence of consecutive peanut monoculturing [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 72: 11 - 18.
- [8] Xiong W, Li R, Ren Y, et al. Distinct roles for soil fungal and bacterial communities associated with the suppression of *Vanilla* *Fusarium* wilt disease [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 107: 198 - 207.
- [9] Liu X, Zhang Y, Ren X J, et al. Long-term greenhouse vegetable cultivation alters the community structures of soil ammonia oxidizers [J]. Journal of Soils and Sediments, 2019, 19 (2): 883 - 902.
- [10] 李生秀. 中国旱地土壤植物氮素 [M]. 北京: 科学出版社, 2008: 3 - 5.
- [11] Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network [J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16 (5): 263 - 276.
- [12] Thomson A J, Giannopoulos G, Pretty J, et al. Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society (B: Biological

- Sciences), 2012, 367(1593): 1157–1168.
- [13] 杨亚东, 宋润科, 马俊永, 等. 长期氮磷不同施用量对土壤细菌、硝化与反硝化微生物数量的影响[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(9): 81–88.
 - [14] Hu H W, Chen D L, He J Z. Microbial regulation of terrestrial nitrous oxide formation: understanding the biological pathways for prediction of emission rates[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2015, 39(5): 729–749.
 - [15] Shcherbak I, Millar N, Robertson G P. Global meta-analysis of the nonlinear response of soil nitrous oxide (N_2O) emissions to fertilizer nitrogen[J]. PNAS, 2014, 111(25): 9199–9204.
 - [16] Ravishankara A R, Daniel J S, Portmann R W. Nitrous oxide (N_2O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century[J]. Science, 2009, 326(5949): 123–125.
 - [17] Hallin S, Philippot L, Löffler F E, et al. Genomics and ecology of novel N_2O -reducing microorganisms[J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(1): 43–55.
 - [18] Schreiber F, Wunderlin P, Udert K M, et al. Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: biological pathways, chemical reactions, and novel technologies[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 372.
 - [19] Domeignoz-Horta L, Putz M, Spor A, et al. Non-denitrifying nitrous oxide-reducing bacteria—An effective N_2O sink in soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 103: 376–379.
 - [20] 陈秀波, 朱德全, 赵晨晨, 等. 凉水国家自然保护区不同林型红松林土壤 *nosZ* 型反硝化微生物群落组成和多样性分析[J]. 林业科学, 2019, 55(8): 106–117.
 - [21] Dandie C E, Burton D L, Zebarth B J, et al. Changes in bacterial denitrifier community abundance over time in an agricultural field and their relationship with denitrification activity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(19): 5997–6005.
 - [22] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 25–114.
 - [23] Chen Z, Hou H J, Zheng Y, et al. Influence of fertilisation regimes on a *nosZ*-containing denitrifying community in a rice paddy soil[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(5): 1064–1072.
 - [24] Kloos K, Mergel A, Rosch C, et al. Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria[J]. Functional Plant Biology, 2001, 28(9): 991–998.
 - [25] 宋蒙亚, 李忠佩, 吴萌, 等. 不同种植年限设施菜地土壤微生物量和群落结构的差异[J]. 中国农业科学, 2015, 48(18): 3635–3644.
 - [26] 王学霞, 陈延华, 王甲辰, 等. 设施菜地种植年限对土壤理化性质和生物学特征的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2018, 24(6): 1619–1629.
 - [27] Liu Y, Liu X Y, Feng Y F, et al. Composition of a soil organic carbon increment under different vegetable cultivation patterns: a study using three SOC pools[J]. Sustainability, 2018, 11(1): 35.
 - [28] Wang Y, Xu H, Wu X, et al. Quantification of net carbon flux from plastic greenhouse vegetable cultivation: a full carbon cycle analysis[J]. Environmental Pollution, 2011, 159(5): 1427–1434.
 - [29] Song Y, Xu M, Li X N, et al. Long-term plastic greenhouse cultivation changes soil microbial community structures: a case study[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(34): 8941–8948.
 - [30] 高新昊, 张英鹏, 刘兆辉, 等. 种植年限对寿光设施大棚土壤生态环境的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(5): 1452–1459.
 - [31] Yang L Q, Huang B A, Hu W Y, et al. The impact of greenhouse vegetable farming duration and soil types on phytoavailability of heavy metals and their health risk in Eastern China[J]. Chemosphere, 2014, 103: 121–130.
 - [32] Hallin S, Jones C M, Schlöter M, et al. Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment[J]. The ISME Journal, 2009, 3(5): 597–605.
 - [33] 田浩, 杨柳青, 曹文超, 等. 设施菜田与棚外粮田土壤菌群和反硝化气体产生的比较分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(5): 835–844.
 - [34] Bergaust L, Mao Y J, Bakken L R, et al. Denitrification response patterns during the transition to anoxic respiration and posttranscriptional effects of suboptimal pH on nitrous oxide reductase in *Paracoccus denitrificans*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(19): 6387–6396.
 - [35] Menyailo O V, Huwe B. Activity of denitrification and dynamics of N_2O release in soils under six tree species and grassland in central Siberia[J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 1999, 162(5): 533–538.
 - [36] Matlou M C, Haynes R J. Soluble organic matter and microbial biomass C and N in soils under pasture and arable management and the leaching of organic C, N and nitrate in a lysimeter study[J]. Applied Soil Ecology, 2006, 34(2/3): 160–167.
 - [37] Bowden R D, Davidson E, Savage K, et al. Chronic nitrogen additions reduce total soil respiration and microbial respiration in temperate forest soils at the Harvard Forest[J]. Forest Ecology and Management, 2004, 196(1): 43–56.
 - [38] Enwall K, Philippot L, Hallin S. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8335–8343.
 - [39] Tang Y Q, Zhang X Y, Li D D, et al. Impacts of nitrogen and phosphorus additions on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and denitrifying bacteria in Chinese fir plantations[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 103: 284–293.
 - [40] Yaganza E S, Rioux D, Simard M, et al. Ultrastructural alterations of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(11): 6800–6808.
 - [41] Bauhus J, Khanna P K. Carbon and nitrogen turnover in two acid forest soils of southeast Australia as affected by phosphorus addition and drying and rewetting cycles[J]. Biology and Fertility of Soils, 1994, 17(3): 212–218.

封丽梅,林 森,姜茂成,等. 电子供体对向日葵秸秆厌氧发酵产酸和微生物群落结构的影响[J]. 江苏农业科学,2022,50(9):247-252.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.09.039

电子供体对向日葵秸秆厌氧发酵产酸和微生物群落结构的影响

封丽梅,林 森,姜茂成,程秀花,吉慧敏

(扬州大学动物科学与技术学院,江苏扬州 225009)

摘要:为探究电子供体对瘤胃微生物发酵向日葵秸秆产 C2~C6 脂肪酸的影响,采用体外连续传代和高通量测序技术,比较添加乙醇或乳酸对脂肪酸产量及细菌和真菌群落结构的影响。结果表明,添加乙醇和乳酸显著提高了总 C2~C6 脂肪酸的产量,乙醇提高了乙酸、戊酸和己酸产量,乳酸提高了丙酸、丁酸、戊酸和己酸产量。与对照组相比,乙醇组的拟杆菌门相对丰度下降,而变形菌门相对丰度上升;乳酸组的变形菌门相对丰度下降,而放线菌门相对丰度上升。添加乙醇或乳酸对相对丰度前 5 的真菌菌门无显著影响。添加 2 种电子供体都显著改变了细菌和真菌的群落结构。添加乙醇显著提高萨特氏菌属、解琥珀酸菌属和脱硫弧菌属的相对丰度,添加乳酸显著提高巨型球菌属、*Shuttleworthia*、互营球菌属、光冈菌属、未定义的普雷沃氏菌的相对丰度。在种水平上,普雷沃氏菌、亨氏丁酸弧菌、埃氏巨型球菌与丁酸、戊酸产量呈显著相关。

关键词:乙醇;乳酸;瘤胃微生物;向日葵秸秆;C2~C6 脂肪酸

中图分类号:X712 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)09-0247-06

我国是农业大国,主要农作物秸秆产生量为 9.84 亿 t,可收集量达 8.24 亿 t,占全球秸秆总产量的 20% 左右^[1]。2019 年全球向日葵总种植面积约为 2 590 万 hm²,大部分地区在向日葵收获后采用焚烧的方式处理,不仅污染环境,也浪费能源^[2-5]。农作物秸秆含有很高的纤维性碳水化合物,对其进行有效的降解利用和转化已成为研究的热点,而生物质的资源化和能源化利用对能源发展和环境保护具有重要的价值和意义。目前生物法降解废弃物,

主要有酶处理法和微生物处理法,用于生产甲烷、乙醇和挥发性脂肪酸^[6-8]。因具有反应条件温和、污染小的特点,具有巨大的应用潜力^[9-10]。

向日葵秸秆作为丰富的木质纤维素资源,可以发酵生产燃料乙醇,也可直接饲喂反刍动物^[11-12]。瘤胃微生物栖息在反刍动物瘤胃中,是分解利用纤维类物质效率最高的天然微生态体系^[13]。瘤胃微生物可实现厌氧发酵秸秆,获得甲烷和挥发性脂肪酸,这在新型高值化利用方面也具有深度挖掘的价值^[14]。厌氧发酵产生的挥发性脂肪酸主要通过水解和产酸步骤形成,其中,戊酸和己酸是乙酸、丙酸和丁酸进一步合成的产物,并且可提供更多能量^[15-16]。利用乙醇或乳酸作为电子供体,在特定微生物的作用下进行脂肪酸 β 氧化的逆循环实现短链脂肪酸碳链延长,提高戊酸和己酸的产量^[17-18]。相关研究表明,乙醇有助于奶牛瘤胃细菌发酵纤维类底物产生更多的乙酸和己酸,该类电子供体具备帮助细菌利用有机废弃物生产己酸的潜力^[19-20]。目

收稿日期:2021-12-30

基金项目:扬州大学研究生科研与实践创新计划(编号:XSJCX20_032);国家现代农业产业技术体系建设专项;江苏省高校优势学科建设工程。

作者简介:封丽梅(1996—),女,江苏盐城人,硕士研究生,主要从事瘤胃挥发性脂肪酸的功能及代谢研究。E-mail:fenglimeil1996@163.com。

通信作者:林 森,博士,副教授,主要从事瘤胃微生态及分子营养研究。E-mail:linmiao@yzu.edu.cn。

[42] Liu C X, Dong Y H, Sun Q W, et al. Soil bacterial community response to short-term manipulation of the nitrogen deposition form and dose in a Chinese fir plantation in southern China[J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2016, 227(12): 1-12.

[43] 彭卫福. 土壤肥力对水稻氮素利用效率和氮循环相关微生物的影响[D]. 南昌:江西农业大学, 2017.

[44] 万 盼, 胡艳波, 张弓乔, 等. 甘肃小陇山油松与柴胡栽培土壤细菌群落特征[J]. 生态学报, 2018, 38(17): 6016-6024.

[45] King D, Nedwell D B. The influence of nitrate concentration upon the end-products of nitrate dissimilation by bacteria in an anaerobic salt marsh sediment[J]. FEMS Microbiology Letters, 1985, 31(1): 23-28.